ISSN 0073 - 9901
MIBUAH

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO, SP — BRASIL

Memórias do Instituto Butantan

VOLUME 53 NÚMERO 2, 1991

• NESTA EDIÇÃO
BOLETIM DE
BIOTECNOLOGIA, V. 2

SciELO

As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Químicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

São publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of communication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsability for statements and opinions advanced by contributors.

Diretor do Instituto Butantan
Dr. Isaias Raw

Comissão Editorial
Henrique Moisés Canter — Presidente
Adolpho Brunner Júnior — Membros
Olga Bohomoletz Henriques
Raymond Zelnik
Sylvia Lucas

Renata Lara Paes de Barros — Bibliotecária

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, Current Contents, Index Medicus.

Periodicidade: irregular
Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.
Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500
05504 — São Paulo, SP — Brasil
Telefone/Telephone: (011) 813-7222 — R. 129 — Telex: (011) 83325 BUTA-BR
Telefax: (011) 815-1505

SciELO

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan — São Paulo — SP — Brasil

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

Volume 53, número 2, 1991

São Paulo, SP — Brasil
1991

SciELO

MEMÓRIAS do INSTITUTO BUTANTAN (Secretaria de Estado da Saúde)
São Paulo, SP — Brasil, 1918 —

1991, *53* (1, Supl. 1,2)

ISSN 0073-9901
MIBUAH

CDD 614.07205

Solicita-se permuta/Exchange desired

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 53, n. 2, 1991

SUMÁRIO/CONTENTS

Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológica dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas.

Quality control of animal venoms and of their correspondent antivenoms: I. Standardization of the assay methods to analise the biochemical and pharmacological properties of venoms from some snakes belonging to the genus *Bothrops* and *Crotalus* by using samples of venoms dried on at room temperature or lyophilized.

M.F.D. FURTADO, G.M.D.D. COLLETTO, W. DIAS DA SILVA..... 149

The Brazilian species of the spider genus **Ephebopus** Simon, 1892 (Araneae, Theraphosidae, Avicullariinae), with description of. **E. natuman**, n. sp.

As espécies brasileiras do gênero **Ephebopus** Simon, 1892 (Araneae, Theraphosidae, Avicullariinae) com descrição de **Ephebopus natuman**, sp. n.

Sylvia LUCAS, Pedro Ismael da SILVA JR., Rogério BERTANI..... 161

Albinismo em serpentes neotropicais
Albinism in neotropical snakes

Ivan SAZIMA, Marcos DI-BERNARDO..... 167

Variação na composição do leite da coelha **(Oryctolagus cuniculus)**
Variation in the composition of rabbit's milk **(Oryctolagus cuniculus)**

F. SOGORB S., S.B. DAMY, U.P. RODRIGUES, L.C.A.G. CHAGURI... 175

Development of antibody response and clinical and hemalogical alterations in horses immunized with snake venoms for the production of antivenom in Costa Rica.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Desenvolvimento da resposta imunitária e alterações clínicas e hematológicas em cavalos imunizados com venenos de serpentes para produção de antiveneno na Costa Rica.

Ricardo ESTRADA, Abel ROBLES, Jorge ALVARADO, Ermila ROJAS, Nuria GONZÁLEZ, Eduardo SEGURA, José Maria GUTIÉRREZ..... 181

Nomenclatura em toxinologia. Relações com a comunicação química entre organismos e propriedades biológicas de toxinas.

Nomenclature in toxinology. Relations with the chemical communication between organisms and biological properties of toxins.

José Carlos de FREITAS..... 191

The nest and the tadpole of **Hyla wavrini**, Parker (Amphibia, Anura)

Os ninhos e os girinos de **Hyla wavrini**, Parker (Amphibia, Anura)

Marcio MARTINS, Glória MOREIRA..... 197

Influencia del ayuno sobre la produccion de veneno en **Bothrops alternatus** (Ophidia: Viperidae: Crotalinae)

Starvation period and snake venom production in **Bothrops alternatus** (Ophidia: Viperidae: Crotalinae)

F. FRANCINI, F.O. PELUSO, C. S. GRISOLIA..... 205

COLETÂNEA DE RESUMOS DE TRABALHOS PUBLICADOS PELOS PESQUISADORES DO INSTITUTO BUTANTAN (1990)..... 213

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA..... 1

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991

CONTROLE DE QUALIDADE DOS VENENOS ANIMAIS E DOS CORRESPONDENTES ANTIVENENOS.

I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops e Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas.

Maria de Fátima D. FURTADO[1]
G.M.D.D., COLLETTO[3*]
Wilmar DIAS DA SILVA[2]

RESUMO: Para a avaliação das atividades promotoras da coagulação do fibrinogênio e do plasma e indutoras de edema, hemorragia, necrose e mortalidade presentes no veneno de algumas serpentes brasileiras *(B. alternatus, B. atrox, B. cotiara, B. jararaca, B. jararacussu, B. moojeni, B. neuwiedi* e *Crotalus durissus terrificus)* foram padronizados métodos de ensaio. De cada espécie de serpente foram preparadas misturas homogêneas de venenos, o teor protéico determinado pelo método de Lowry et al. (6) e cada mistura dividida igualmente em duas amostras, uma sendo seca sob vácuo à temperatura ambiente (VS) e a outra liofilizada (VL), e ambas armazenadas a 20°C. O teor protéico foi da ordem de 1.0-1.5 mg/mg de veneno seco na maioria das espécies e da ordem de 0.8-0.85 mg/mg no veneno de *B. cotiara*. A atividade enzimática, medida pela proteólise da caseína, foi muito pronunciada nos venenos de *B. atrox* e *B. moojeni*, baixa no veneno de *B. cotiara*, intermediária no veneno das demais espécies do gênero *Bothrops* e praticamente in-

1 Seção de Venenos e
2 Laboratório Especial de Imunoquímica, Instituto Butantan,
3 Serviço de Informática e Análise de Dados do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Correspondência: Dra. Maria de Fátima D. Furtado
Seção de Venenos — Instituto Butantan
Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil

*"A Comissão de Coordenação e Produção de Soros Hiperimunes do Instituto Butantan" recomendou a titulação dos anticorpos específicos para cada uma das principais atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos dos animais peçonhentos da fauna brasileira presentes nos correspondentes soros hiperimunes produzidos pela "Seção de Concentração e Fracionamento de Soros". Esta comunicação relata os resultados referentes à padronização de métodos *in vitro* e *in vivo* que permitem uma avaliação semiquantitativa das principais atividades dos venenos das serpentes dos gêneros *Bothrops e Crotalus*.

Recebido para publicação em 26.7.1990 e aceito em 18.6.1991

SciELO

FURTADO, M.F.D., COLLETTO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero Bothrops e Crotalus usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. Mem. Inst. Butantan, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

detectável no veneno de *C. d. terrificus*. As atividades hemorrágica e necrotizante, conquanto presentes no veneno de todas as espécies botrópicas, foram bastante elevadas no veneno de *B. neuwiedi* e ausentes no veneno de *C. d. terrificus*. Todos os venenos testados exibiram atividade edematogênica. A atividade promotora de coagulação, embora presente em todos os venenos, foi mais alta nos venenos de *B. atrox, B. cotiara* e *B. neuwiedi*. A atividade letal, medida em termos de DL_{50}, foi marcadamente elevada no veneno de *C. d. terrificus* e alta nos venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedi* em comparação com os venenos das demais serpentes do gênero *Bothrops*. Em todos os ensaios as amostras de veneno VS e VL foram sempre testadas em paralelo. Conquanto as atividades enzimáticas e biológicas dos venenos não se diferissem em ambas as amostras, o processo de liofilização deveria ser o método de escolha pelo fato de associar, durante o processo de secagem, congelação e vácuo, condições que presumivelmente preservariam melhor a configuração molecular natural da maioria das proteínas.

UNITERMOS: *Peçonhas animais, processos de secagem e atividades biológicas dos venenos ofídicos.*

INTRODUÇÃO

As peçonhas de origem animal são misturas complexas ricas em toxinas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos. A natureza e as propriedades biológicas desses componentes são típicos da espécie animal de onde provieram enquanto a concentração de cada um deles, dentro da mesma espécie, pode variar com a região geográfica em que o animal se desenvolveu, com os hábitos, com as mudanças das estações, com a idade e o sexo e com o tempo decorrido entre uma extração de veneno e a imediatamente anterior. Além disso, a reunião de enzimas, substratos eventuais e inibidores em proporções variáveis segundo as condições das coletas antecipa proteólises e inibições de enzimas numa série caótica e imprevisível de eventos. Assim, não se pode esperar que as misturas de veneno obtidas pela reunião das amostras de várias coletas sejam homogêneas.

As misturas de veneno antes de ser utilizados quer como material de pesquisa pura quer como antígeno para a produção de soros antivenenos precisam passar pelo crivo de um controle de qualidade no qual sejam incluídos métodos que avaliem tanto as principais características fisico-químicas dos venenos como suas atividades bioquímicas e biológicas.

Em 1955 o comitê de especialistas em "Padrões Biológicos da Organização Mundial de Saúde" reuniu-se em Genebra e discutiu o problema da heterogeneidade das misturas de veneno produzidas pelas diferentes instituições públicas e privadas espalhadas pelo mundo e a necessidade da padronização de métodos para a obtenção de padrões internacionais de referência tanto dos venenos de origem animal como dos correspondentes soros antivenenos. Os resultados dessa reunião foram publicados no "19º Informe-OMS" (18). Entre as principais decisões há a sugestão de uma análise do veneno de *Bothrops jararaca* e a possível utilização desse veneno como "veneno-referência" para os venenos do gênero *Bothrops*. Logo depois dessa reunião vários trabalhos foram publicados visando padronizar métodos para a produção de venenos-referência (Schottler, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). Entretanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios.

SciELO

FURTADO, M.F.D., COLLETTO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero **Bothrops** e **Crotalus** usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 149-159, 1991.

A Organização Mundial de Saúde retomou esse problema em 1979 quando organizou, em Zurique, um novo encontro dos especialistas para analisar os progressos observados na identificação das atividades biológicas dos venenos animais e nos respectivos antivenenos. Os participantes do encontro recomendaram o estabelecimento de veneno-referência para 8 espécies de serpentes e que esses padrões fossem obtidos por meio de métodos simples que pudessem ser conduzidos mesmo em laboratórios mais modestos (19). Como não havia representantes brasileiros naquela reunião, as serpentes brasileiras não foram incluídas entre as eleitas pelos especialistas que participaram daquele encontro (16, 17, 19) (Tabela 1).

Em 1985 o Ministério da Saúde estimulou o aumento da produção de soros antivenenos no mercado nacional criando o ''Grupo de Trabalho sobre Padronização do Soro Antiofídico do Ministério da Saúde'' junto ao ''Programa de Autosuficiência em Imunobiológicos'' e convocou para um esforço conjunto de produção desses soros o Instituto Butantan, o Instituto Vital Brazil e a Fundação Ezequiel Dias (1). Ficou evidente, desde logo, a necessidade do uso de ''Venenos-Referência Nacionais'' e a padronização dos métodos de ensaio das atividades biológicas dos venenos para garantir uniformidade aos soros antivenenos e uso no território nacional. Coube ao Instituto Butantan o encargo de preparar e fornecer os venenos às demais instituições. A ''Seção de Venenos'' do Instituto Butantan, seguindo as normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (19), prepara venenos-referência para os venenos crotálico e botrópico. Durante o preparo desses padrões defrontou-se com a falta de métodos reprodutíveis e de fácil execução para titular as principais atividades biológicas dos venenos e determinar a capacidade neutralizante dos correspondentes soros antivenenos.

A Seção de Venenos, a Seção de Concentração e Fracionamento de Soros e o Laboratório Especial de Imunoquímica estabeleceram um programa colaborativo para desenvolver aqueles métodos.

Neste trabalho são relatados os resultados obtidos com a padronização dos métodos para a determinação da $DL_{50\%}$ em camundongos e das atividades hemorrágica, necrosante, edematogênica, coagulante sobre fibrinogênio, coagulante sobre plasma e caseinolítica usando o veneno das espécies mais comuns do gênero *Bothrops (B. alternatus, B. atrox, B. cotiara, B. jararaca, B. jararacussu, B. moojeni e B. neuwiedi)* e o veneno do *Crotalus durissus terrificus*. Estes estudos foram feitos analisando-se em paralelo amostras de veneno seco a vácuo como tradicionalmente preparado no Instituto Butantan e amostras de veneno liofilizado.

MATERIAL E MÉTODOS

SERPENTES: Foram utilizadas serpentes pertencentes a 7 espécies do gênero Bothrops *(B. alternatus, B. atrox, B. cotiara, B. jararaca, B. jararacussu, B. moojeni* e *B. neuwiedi)* e uma espécie do gênero *Crotalus (C. durissus terrificus)*. O veneno dessas serpentes, com exceção do veneno da *B. atrox* que foi incluído em substituição ao da *B. pradoi*, são utilizados para o preparo dos soros antivenenos botrópico e crotálico.

Os venenos foram extraídos pelo método tradicionalmente usado no Instituto Butantan. Os frascos contendo as amostras de veneno recém-colhidas foram colocados em banho de água-gelo, agitados para que o resfriamento se processasse rapidamente e, a seguir, divididos em duas alíquotas: uma das alíquotas foi

SciELO

colocada em placas de Petri que foram transferidas para dessecadores contendo cloreto de cálcio, e deixados à temperatura ambiente, sob vácuo, por 24h, tempo suficiente para a secagem do veneno. A outra alíquota foi centrifugada a 3.000 rpm/15 min a 4°C para remover os resíduos sólidos e liofilizada. A primeira alíquota foi rotulada ''veneno seco'' e a segunda ''veneno liofilizado''. Cada amostra continha veneno obtido de vários animais da mesma espécie com idade, sexo e procedência variáveis.

DOSAGEM DE PROTEÍNAS. O teor de proteínas totais de cada amostra de veneno foi determinado pelo método colorimétrico de Lowry et al. (6).

DOSE MÍNIMA COAGULANTE (DMC). A DMC é definida como a menor quantidade de veneno (em mg de veneno seco por litro de solução teste) que coagula ou uma solução de fibrinogênio bovino a 2g/litro (DMC-F) ou uma solução padronizada de plasma eqüino contendo 2,8g de fibrinogênio/litro (DMC-P) em 60 segundos a 37°C. Os valores para DMC-F ou DMC-P foram obtidos através de análise de regressão linear do ''tempo de coagulação'' sobre a ''quantidade de veneno'', sendo a última transformada em logaritmo neperiano (ln). É considerada dose mínima a quantidade de veneno que coagula ou o fibrinogênio ou o plasma em 60 segundos.

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE CASEÍNA. Para a determinação da atividade proteolítica empregou-se o método de Kunitz (4), modificado por Lomonte & Gutierrez (5), que utiliza caseína como substrato. Um mililitro da solução de caseína a 1% foi adicionado a 1 ml da solução de veneno em 0.15 M NaCl e a mistura incubada durante 30 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 3,0 ml de ácido tricloroacético a 5% e os tubos deixados em repouso à temperatura ambiente por 30 min. A seguir, os tubos foram centrifugados durante 10 min a 3.000 rpm e as absorvências dos sobrenadantes em densidade óptica foram lidas a 280nm, usando-se, como ''branco'', a amostra em que a solução de veneno havia sido substituída por salina. Cada amostra de veneno foi ensaiada em quadruplicatas. A atividade proteolítica, tipo caseinolítica, foi expressa em unidades/mg veneno obtida pela fórmula:

U/mg = 0.D. 280 nm x 100/mg veneno

DOSE LETAL 50% (DL_{50}). Grupos de 8 camundongos albinos, não-isogênicos, pesando 18 a 22 gramas, foram injetados, i.p., com 0.5 ml de cada solução de veneno diluído em 0.15 M NaCl. O número de animais mortos para cada dose de veneno foi anotado num período de observação de 48h. A DL_{50} foi calculada pela análise de probitos usando o número total de camundongos mortos por dose de veneno durante o período de observação.

DOSE MÍNIMA HEMORRÁGICA (DMH). A DMH é definida como a menor quantidade de veneno, em μg, que, quando injetada i.d., na pele do dorso do rato, produz uma lesão hemorrágica de 10mm de diâmetro em leituras feitas 24h após a injeção. Para a determinação da DMH usou-se, neste trabalho, o método descrito por Kondo et al. (3). Alíquotas de 0,1 ml das soluções de veneno em 0.15M de NaCl em concentrações que variavam de 5 a 100μg foram injetadas, i.d., na pele previamente depilada, do dorso de ratos adultos (230-270g) sob anestesia leve com éter. Vinte e quatro horas depois, os animais foram anestesiados com éter, exanguinados por punção dos vasos do pescoço, a pele do dorso removida e transferida para um suporte que permitisse transluminação e, com o auxílio de um paquímetro, dois diâmetros em ângulo reto eram medidos. Com esses valores calculava-se o diâmetro médio para cada dose de veneno. A seguir, através de

SciELO

regressão linear, foram obtidas as DMH, que é a dose de veneno capaz de produzir uma lesão hemorrágica de 10mm.

DOSE MÍNIMA NECROSANTE (DMN). A DMN é definida como a menor quantidade de veneno em μg que, quando injetada, i.d., na pele do rato, produz após 3 dias uma lesão necrótica característica. Para a determinação da DMN usou-se o mesmo método descrito acima para a determinação da DMH. Uma DMN corresponde à dose de veneno que produz uma lesão necrótica com 5mm de diâmetro.

DETERMINAÇÃO DO EFEITO EDEMATOGÊNICO. Para a determinação da atividade edematogênica dos venenos empregou-se, com algumas modificações, o método de Yamakawa et al. (20). Grupos de 8 camundongos albinos, não isogênicos, pesando 18-22g, foram injetados, i.c., no coxim da pata direita, ''experimental'', com 0.05 ml da solução de veneno diluído em 0.15 M NaCl estéril e no correspondente local da pata esquerda, ''controle'', apenas 0.05 ml da mesma solução de salina estéril. A espessura dos coxins foi medida usando-se um micrômetro (Mitutoy-sensibilidade de 0,01-9,0 mm) nos tempos 15 min, 30 min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. O edema foi expresso pela diferença entre os aumentos de espessura nos coxins das patas ''experimental'' e ''controle'' dividida pelos valores das espessuras nas patas ''controle'' multiplicado por 100. Com esses valores construiu-se um gráfico do aumento da espessura da pata ''experimental'' em função do tempo.

A DOSE EDEMATOGÊNICA MÍNIMA (DEM). É definida como a menor quantidade de veneno que induz 30% do aumento máximo da espessura da pata ''experimental''. Para determinar a DEM usou-se o mesmo método descrito acima, utilizando-se, porém, diferentes doses de veneno e medindo-se as espessuras 3h após a injeção do veneno. Os valores correspondentes aos aumentos na espessura das patas ''experimentais'' foram analisados através de regressão linear tomando-se como DEM a dose que produzia 30% de aumento.

As amostras de ''veneno seco'' e ''veneno liofilizado'' foram ensaiadas em paralelo em todos os testes. Todas as soluções de veneno foram preparadas no momento do uso.

ANÁLISE ESTATÍSTICA. Os dois processos, seco a vácuo e liofilizado, foram comparados em todas as variáveis estudadas através de testes não paramétricos de comparação de duas amostras pareadas (Wilcoxon paired sample test ''Z''), considerando-se como ''pares'' os resultados obtidos na mesma espécie nos dois processos (21).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 2 e 3 resumem os resultados obtidos neste trabalho. Quase todos os venenos analisados contêm um teor protéico da ordem de 1,0-1,5 mg de proteínas totais/mg de veneno dosadas pelo método colorimétrico de Lowry et al. (6). A exceção é o veneno de *B. cotiara* cujos valores para a concentração em proteínas totais são da ordem de 0,85mg/mg de peso seco de veneno. A diferença para mais entre os valores para proteínas totais obtidas pelo método colorimétrico em relação aos valores em peso seco de veneno pode ser explicada pela maior quantidade de aminoácidos aromáticos nos venenos em relação ao padrão na construção da curva de referência e padronização dos reagentes de albumina bovina utilizada. Os teores protéicos em ambas as alíquotas, ''veneno seco'' e

SciELO

''veneno liofilizado'', não variaram significantemente (Z = 0,21; P = 0,83) para cada amostra de veneno, indicando que os dois processos de desidratação, isto é, secagem à temperatura ambiente e liofilização, foram similarmente eficazes.

A atividade caseinolítica foi estudada através de análise de variância de dois fatores: processo e espécie. Essa análise demonstrou que não existe diferença significante entre os dois processos (F = 0,282; P = 0,60) mas existem diferenças significantes entre as espécies (F = 1000,0; P = 0,000). A seguir foi utilizado o teste de Tukey (Tabela 4) para se verificar as diferenças entre cada duas espécies, e observamos que as espécies *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops cotiara* não diferem entre si, mas diferem de todas as outras e são as com menor ação caseinolítica. *Bothrops alternatus* é significativamente diferente de todas as outras. *Bothrops jararaca, B. neuwiedi* e *B. jararacussu* não diferem entre si mas diferem significativamente de todas as outras; *B. moojeni* e *B. atrox* são significativamente diferentes entre si e entre todos os outros venenos, sendo os mais ativos na caseinólise.

Como, via de regra, a atividade caseinolítica não variava apreciavelmente nas alíquotas de veneno seco e liofilizado, os métodos de secagem à temperatura ambiente e liofilização do veneno ou não interferiram ou exerceram igual efeito sobre as enzimas proteolíticas que hidrolizam caseína que se encontram presentes nos venenos.

A ação coagulante sobre o fibrinogênio, ação tipo trombina, apresentou ampla variação entre os venenos ensaiados, sendo os venenos de *B. atrox, B. cotiara* e *B. neuwiedi* os mais ativos, como podemos observar na Tabela 2. Já a ação coagulante sobre o plasma foi muito mais potente no veneno da *B. moojeni* (DMC-P = 22,6μg) quando comparado com os venenos das demais serpentes do gênero *Bothrops*. O veneno do *C. d. terrificus* mostrou-se muito pouco ativo (DMC-P = 392-329μg). As comparações entre os dois processos (vácuo e liofilizado) nas duas atividades coagulantes (fibrinogênio e plasma) foram realizadas através dos testes de Wilcoxon e mostraram que não existem diferenças significantes entre os dois processos (Z = 0,07; P = 0,94 para o fibrinogênio e para o plasma).

A atividade tóxica dos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* variou muito com a espécie: os venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedi* foram os mais tóxicos (DL_{50} em torno de 30μg/camundongo) enquanto os venenos de *B. atrox* e *B. moojeni* foram os menos tóxicos (DL_{50} em torno de 90 μg/camundongo). Também, sem nenhuma surpresa, o veneno mais tóxico foi o de *C. d. terrificus* (DL_{50} em torno de 1,0 a 1,2 μg/camundongo) A comparação entre os dois processos deu um resultado no limite de 5% (Z = 1,89; P = 0,059), sendo que o processo a vácuo mostrou valores maiores, e portanto com menor toxicidade.

A atividade hemorrágica presente nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* variou muito pouco entre as espécies estudadas. A DMH oscilou entre 12 e 17 μg/rato, com exceção do veneno de *B. neuwiedi* que apresentou uma atividade hemorrágica muito alta com a DMH em torno de 8,0μg/rato. Como era de se esperar, o veneno de *C. d. terrificus* não produziu lesão hemorrágica no local de injeção. A comparação entre os dois processos mostrou que os resultados não diferem estatisticamente (Z = 1,27; P = 0,20).

A atividade necrosante dos venenos botrópicos foi semelhante à observada com a atividade hemorrágica. A DMN variou de 50 a 70 μg/rato na maioria dos venenos sendo, contudo, mais baixa no veneno de *B. neuwiedi* (35 μg/rato). O

SciELO

veneno de *C. d. terrificus* também não produziu necrose no local da injeção do veneno. Os dois processos mostraram resultados semelhantes ($Z = 0,25$; $P = 0,80$).

A atividade edematogênica dos venenos botrópicos foi marcadamente uniforme nas diferentes espécies, sendo os venenos de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* os mais ativos. Também neste caso os dois processos não deram resultados diferentes estatisticamente ($Z = 1,61$; $P = 0,10$).

A análise de correlação entre a atividade edematogênica e a atividade necrosante mostrou um resultado próximo do nível de significância de 5% ($Z = 0,51$; $P = 0,06$). Isso sugere que outros estudos destinados a esclarecer tal correlação possam ser conduzidos.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que três métodos *in vitro* (titulação de proteínas, atividade coagulante sobre fibrinogênio e plasma e atividade caseinolítica), quatro métodos *in vivo* (atividade letal, atividade hemorrágica, atividade necrosante e atividade edematogênica) podem servir como métodos de rotina para o controle de qualidade dos venenos de serpentes coletados e armazenados para fins de pesquisa e de produção de soros antivenenos. Verificou-se, além disso, que para uma mesma espécie e para a mesma partida de veneno as amostras processadas por secagem a vácuo e liofilizadas não apresentam diferenças em todas as variáveis estudadas.

Observações recentes mostraram que as enzimas proteolíticas presentes nos venenos de *Agkistrodon contortrix*, *Bothrops atrox, moojeni* e *Echis carinatus sochureki* eram inativadas, mais intensa e rapidamente a 37° C e, a seguir, em ordem decrescente, a temperatura ambiente, a 4° C e a 20° C (7). Desde que as atividades enzimáticas e biológicas dos venenos não diferem nos dois processos, deveria-se escolher a liofilização como o método de preparação de veneno, pelo fato de associar, durante o processo de secagem, congelação e vácuo, condições que presumivelmente preservariam melhor a configuração molecular natural da maioria das proteínas.

De posse dos principais parâmetros para a avaliação das principais atividades biológicas dos venenos das serpentes brasileiras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, pode-se titular os anticorpos presentes nos correspondentes soros antivenenos que especificamente neutralizam as atividades proteolíticas, coagulante do fibrinogênio e do plasma, edematogênica, hemorrágica, necrosante e letal. Tais informações serão importantes não só para o conhecimento das atividades antitóxicas dos anticorpos como para o controle dos processos de fracionamento e concentração dos soros antivenenos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Srta. Vera Lúcia Ap. Rodrigues pela assistência técnica.

ABSTRACT: Methods were standardized to evaluate the fibrinogen or plasma coagulation promoting effects and the edematogenic, hemorrhagic, necrotising and lethality inducing activities present in some Brazilian snake venoms *(B. alternatus, B. atrox, B. cotiara, B. jararaca, B. jararacussu, B. moojeni, B. neuwiedi* and *Crotalus durissus terrificus)*. Venoms from each species were pooled, the protein contents determined by the Lowry's method, divided into two equal samples, one being vacuum-

SciELO

dried at room temperature (DV) and the other lyophilized (LV), and stored at -20°C. The protein contents were around 1.0-1.5 mg/mg of dried venom in the venoms from the most species and around 0.8-0.85 mg/mg of dried venom in the venom from *B. cotiara*. Enzymatic activities, as measured by casein proteolysis, was very pronounced in the venoms from *B. atrox and B. moojeni*, low in the venom from *B. cotiara*, intermediate in the other *Bothrops* venoms and barely detectable in the venom from *C. d. terrificus*. The hemorrhagic and necrotising activities although present in the venom of all *Bothrops* species were pronounced in the venom of *B. neuwiedi* and absent in the venom from *C. d. terrificus*. All venoms tested exibit patent edematogenic activity. The coagulation promoting activity present in all venoms was higher in the venoms of *B. atrox, B. cotiara* and *B. neuwiedi*. The lethal activity, measured in terms of LD_{50}, was remarkably higher in the venoms of *C. d. terrificus* and high in the venoms of *B. jararaca* and *B. neuwiedi* in comparison with the other *Bothrops* species. The drying procedures analyzed had no influence on the venoms biological and enzymatic activities. Although a decrease in the enzymatic or in the biological activities was not observed neither in DV nor in LV, lyophilization of the snake venoms to be stored should be the choice method because the association of freezing temperature and vacuum preserve better the correct molecular configuration the most of proteins.

KEYWORDS: *Animal venoms, drying procedures and biological activities of snake venoms.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. A ação do Ministério da Saúde no controle dos acidentes ofídicos em âmbito nacional. Brasília. 1986.
2. CHAYKIN, S. Methods for protein determination. In: *Biochemistry Laboratory Techniques*. New York, John Wiley. Cap. 2, p. 14-21, 1966.
3. KONDO, H.; KONDOS.; IKEZAWA, K.; MURATA, R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 13, 43-51, 1960.
4. KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J.Gen.Physiol.*, 40: 291-310, 1947.
5. LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J.M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseina. *Rev.Biol.Trop.*, 31(1): 37-40, 1983.
6. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, I.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.biol.Chem.*, 193: 265-275, 1951.
7. MEIER, J.; ADLER, C.; LO CASCIO, R. A prospective study on enzyme stability of three VIPERIDAE snake venoms stored as liquid under different conditions. 8th European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Poréc, Yogoslavia, *Toxicon*, Vol. 28, pag. 158, 1990.
8. SCHOTTLER, W.H.A. — Toxicity of the principal snake venoms of Brazil. *Amer.J.trop.Med.*, 31: 489-499, 1951.
9. SCHOTTLER, W.H.A. — Antigen-antibody relations in the present antivenin production of Brazil. *Amer.J.trop.Med.*, 31: 500-509, 1951.
10. SCHOTTLER, W.H.A. — Problems of antivenin standardization. *Bull. World Hlth. Org.*, 5: 293-320, 1952.
11. SCHOTTLER, W.H.A. — Aspectos metodológicas da titulação de soros antipeçonhentos. *Mem. Inst. Butantan*, 26: 249-256, 1954.
12. SCHOTTLER, W.H.A. — Serological analysis of venoms and antivenins. *Bull. World Hlth. Org.*, 12: 877-903, 1955.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

FURTADO, M.F.D., COLLETTO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero **Bothrops** e **Crotalus** usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. **Mem. Inst. Butantan**, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

13. SCHOTTLER, W.H.A. — Observações miscelânicas sobre peçonhas ofídicas e antivenenos. *Mem. Inst. Butantan*, 27: 73-105, 1955/56.
14. SCHOTTLER, W.H.A. — Reference toxins for antivenin standardization. *Bull. World Hlth Org.*, 19: 341-361, 1958.
15. SILES VILLARROEL, M. Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, 83p., 1977.
16. THEAKSTON, R.D.G. Characterization of venoms and standardization of antivenoms. In: *Natural toxins*. Ed. John B. Harris. Chap. 15: 287-303. Claredon Press. Oxford, 1986.
17. THEAKSTON, R.D.G. & REID, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. World Hlth*. Org., 61: 949-956, 1983.
18. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Biological Standardization. *Wld. Hlth Org. Tech. Rep. Ser.*, 108, 1956.
19. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *Off set Publication nº 58*. World Health Organization. Geneva, 1981.
20. YAMAKAWA, M.; NOZAKI, M.; HOKAWA, Z. Fractionation of Sakishimahabu *(Trimeresurus elegans)* venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. In: A. OHSAKA, K. HAYASHI, O.Y. SAWAY (eds.). *Animal, Plant and Microbial Toxins*, vol. 1 Plenum Press, New York, 1976.
21. ZAR, J.H. Bioestatistical Analysis. Second Edition. Prentice-Hall, INC, New Jersey. v- xiv, 1-718. 1984.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

FURTADO, M.F.D., COLLETTO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero **Bothrops** e **Crotalus** usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. **Mem. Inst. Butantan**, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

TABELA 1
Venenos Referência Internacionais propostos (16).

ESPÉCIES	PROCEDÊNCIA
Naja n. kaouthia	Tailândia
Naja scutatus	Austrália
Echis carinatus	*Mali*
Echis carinatus	Irã
Vipera russelli	Tailândia
Crotalus atrox	México
Bothtops atrox asper	Costa Rica
Trimeresurus flavoviridis	Japão

TABELA 2
Quantidade de proteínas totais, atividade caseinolítica e dose mínima coagulante sobre fibrinogênio e plasma dos venenos de oito espécies de serpentes brasileiras.

Espécies	Processo de secagem	Quantidade de proteína (μg prot./mg ven.) (X±SD)	Atividade caseinolítica (U/mg ven.) (X±SD)	Dose mínima coagulante fibrinogênio (mg/l)	plasma (mg/l)
B. alternatus	vácuo	1.441±54	48,8±3,0	191,8	47,1
	liofilizado	1.010±27	47,3±3,6	225,1	51,0
B. atrox	vácuo	1.169±56	243,0±8,0	103,2	67,8
	liofilizado	1.253±42	198,3±6,8	57,8	80,9
B. cotiara	vácuo	847±11	10,5±2,4	78,75	92,4
	liofilizado	870±19	13,0±3,7	97,2	84,5
B. jararaca	vácuo	1.156±12	83,7±3,8	124,8	115,0
	liofilizado	1.147±54	105,8±5,3	209,8	90,6
B. jararacussu	vácuo	1.129±56	106,0±2,7	236,6	42,7
	liofilizado	1.037±26	95,8±3,5	211,9	42,8
B. moojeni	vácuo	1.344±103	163,8±10,0	195,7	22,6
	liofilizado	1.372±78	203,0±12,8	205,7	19,3
B. neuwiedi	vácuo	1.256±36	101,0±3,7	101,1	81,2
	liofilizado	1.472±37	98,3±5,7	54,4	86,2
C.d. terrificus	vácuo	1.504±53	9,4±1,8	122,3	392,8
	liofilizado	1.363±53	7,7±1,2	105,3	329,1

SciELO

FURTADO, M.F.D., COLLETTO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero **Bothrops** e **Crotalus** usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 149-159, 1991.

TABELA 3
Dose Letal 50% (DL_{50}, Doses Mínimas Hemorrágicas, Necrosante e Endematogênica de venenos de oito espécies de serpentes brasileiras.

Espécies	Processo de secagem	Dose letal 50% (μg/camundongo)	Dose mínima hemorrágica (μg/rato)	Dose mínima necrosante (μg/rato)	Dose mínima edematogênica (μg/camundongo)
B. alternatus	vácuo	78,5(69-91)	16,8	64,4	0,64
	liofilizado	67,5(59-76)	14,4	70,6	0,66
B. atrox	vácuo	104,1(94-117)	15,8	52,5	0,45
	liofilizado	89,1(84-96)	13,6	59,5	0,33
B. cotiara	vácuo	57,6(51-66)	20,0	58,6	0,39
	liofilizado	35,2(27-41)	20,2	67,8	0,52
B. jararaca	vácuo	28,2(26-32)	15,5	66,5	0,38
	liofilizado	24,7(23-26)	15,6	66,9	0,51
B. jararacussu	vácuo	60,2(51-69)	17,4	60,7	0,46
	liofilizado	58,8(52-67)	17,7	50,2	0,55
B. moojeni	vácuo	90,1(72-98)	17,3	55,3	0,35
	liofilizado	92,3(78-100)	15,9	45,5	0,35
B. neuwiedi	vácuo	36,5(31-44)	7,7	40,2	0,36
	liofilizado	30,3(25-41)	8,9	33,6	0,40
C.d. terrificus	*vácuo*	*1,1(0,8B-1,27)*	–	–	*0,34*
	liofilizado	*1,2(0,96-1,67)*	–	–	*0,5B*

TABELA 4
Testes de comparações múltiplas entre as espécies de *Bothrops* para os valores da atividade caseinolítica.

ESPÉCIE	MÉDIA	GRUPOS HOMOGÊNIOS
C.d. terrificus	8.71429	*
B. cotiara	11.75000	*
B. alternatus	48.00000	*
B. jararaca	96.28571	*
B. neuwiedi	99.62500	*
B. jararacussu	100.87500	*
B. moojeni	180.57143	*
B. atrox	220.62500	*

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 53, n. 2, p. 161-166, 1991

THE BRAZILIAN SPECIES OF THE SPIDER GENUS *EPHEBOPUS* SIMON, 1892 (ARANEAE, THERAPHOSIDAE, AVICULARIINAE), WITH DESCRIPTION OF *E. UATUMAN* N. SP.

Sylvia LUCAS*
Pedro Ismael da SILVA JÚNIOR*
Rogério BERTANI*

ABSTRACT: A new species of the genus *Ephebopus* Simon, 1892, *E. uatuman*, is described from the Amazonean Region of Brazil. Concerning *E. violaceus* Mello Leitão, 1930, type misplaced or lost despite registered in the Arachnological Collection of the Museu Nacional do Rio de Janeiro, Brazil, we conclude, after the short description of the author, that this species exhibit characteristics of the genus *Avicularia*, since the first ocular row is very procurve. The total lenght of only 23mm, the design on the dorsal side of the abdomen and the division of the posterior tarsal scopulae suggests that the specimen is a juvenile. Therefore two are the Brazilian species of the genus *Ephebopus*: *E. murinus* and *E. uatuman*.

KEYWORDS: Taxonomy. Genus *Ephebopus* Simon, 1892 (ARANEAE, THERAPHOSIDAE, AVICULARIINAE) in Brazil: *E. murinus* (Walckenaer), 1837, *E. uatuman* n. sp. *E. violaceus* is synonimous of *Avicularia violacea* (Mello Leitão), 1930.

INTRODUCTION

The genus *Ephebopus* Simon, 1892 is represented in Brazil by two species: *E. murinus* (Walckenaer), 1837 and *E. violaceus* Mello Leitão, 1930.

Lucas et al (1991) described the first known male of *Ephebopus, E. murinus* and transfered the genus to the subfamily AVICULARIINAE due to the presence of spatulate tarsal scopulae, mainly at tarsi I and II of the female, legs without spines or with weak spines, palpal bulb globulous with a long thin embolus, without keels or crests and presence of urticating hairs of type II after the classification of Cooke *et al.* (1972) on the inner side of the apex of the palpal femur.

* Seção de Artrópodos Peçonhentos. Instituto Butantan CP 65, CEP 01051, São Paulo, Brasil.
Recebido para publicação em 24.1.1991 e aceito em 19.6.1991

SciELO

LUCAS, S., SILVA JUNIOR, P.I. da, BERTANI, R. The Brazilian species of the spider genus **Ephebopus** Simon, 1892 (Araneae, Theraposidae, Avicullariinae), with description of **E. Uatuman** n.sp. **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 161-166, 1991

During the faunal rescue that took place on the Hydroelectric Power Station of Balbina, on the Uatuman River, State of Amazonas, Brazil, there were collected numerous specimens of a new species of the genus *Ephebopus*, which description is given here.

Ephebopus uatuman n. sp.
(Fig. 1 to 7)

The types are deposited in the Mygalomorphae Collection of the Venomous Arthropods Laboratory of the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.
Types: Holotype: ♂ (IB 4939), District of Presidente Figueiredo (Hydroelectric Power Station of Balbina, Uatuman River), State of Amazonas, Brazil, feb. 1988, col. M. Costa, Alotype: ♀ (IB 4940) ibidem,
Paratypes: 5 ♀, 2 ♂ (IB 4941), ibidem, 1 juvenile (IB 4941), ibidem.
Etymology: derived from the type locality: Uatuman River.

DESCRIPTION OF THE HOLOTYPE

Measurements in mm.
Total lenght with chelicerae: 34,0
Total lenght without chelicerae: 29,1
Lenght and width of the cephalotorax: 12,0/11,5
Legs: I 56,5 II 50,3 III 44,2 IV 52,9 I-IV-II-III

Cephalotorax longer than wide, foveal groove slightly procurve, eye tubercle low, twice wider than long, anterior median eyes larger than anterior lateral, posterior median eyes of the same syze as the posterior lateral and smaller than the anterior. First row of eyes slightly procurve. Labium slightly wider than long with numerous apical cuspules. Maxillary lobes with cuspules on the inner side, next to the labium. Sternal sigilla submarginal, the posterior pair larger than the two others pairs. Tarsal scopulae extending all over the segment, well developed and spatulate. Metatarsi I and II with scopulae reaching the base of the segment, metatarsi III only present on the 3/4 apical and on metatarsi IV only apical. The spines are scarce, present only on the apex of tibiae and metatarsi, on the ventral side. The palpal bulb in globulous and presents a long and slender embolus, without keels or crests, with a slender fold near the apex. (Fig. 3 and 4). The tibial apophysis is double and present a spine, on the internal side of each spur (Fig. 5). The metatarsus clothes against the external side of the bigger spur. The inner side, near the apex of the palpal femur presents a region of urticating hairs of type II (Fig. 6).

DESCRIPTION OF THE ALOTYPE

The characteristics are very similar to that of the holotype. The tarsal scopulae are more developed and the receptacula seminalis are double, more chitinous on the apex with a common basis (Fig. 7).

COLORATION

The specimens present a greenish color with metallic reflexes, mainly in the females and juveniles. The legs show transversal bands on the segments, just near

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

the articulation, brighter between patella and femur and metatarsus and tarsus. The dorsal surface of the carapace of the males is dark brown covered with few hairs. Sternum and coxae also dark and with short hairs, between them, some longer hairs with paler ends. Abdomen with short dark hairs and also longer reddish hairs on the sides. Ventral side with short hairs, reddish near the apex. The females exhibit a lighter brown color on the dorsal side of the cephalotorax and abdomen. Sternum and coxae are blackish. The ventral side of the abdomen is darker than the dorsal side. Young specimens show legs and spinnerets light reddish brown, in the adults the legs and spinnerets are darker.

BIOLOGY

All specimens were collected during the faunal rescue, near the Uatuman River, on half submerged branches, floating trunks an on the margins. In captivity, males and females build a silk tube very similar to the one constructed by **E. murinus** and they also have the same hair shedding behavior for defense.

DIFERENTIAL DIAGNOSIS

Ephebopus uatuman differs from **E. fossor** Pocock, 1903 and **E. murinus** (Walckenaer), 1837 mainly by the coloration and absence of the pale longitudinal bands present on patellae and tibiae of the last two species. Females of **E. murinus** are bigger and stronger than **E. uatuman**. Such differences were not detected in the males. The palpal bulb aspect is very similar, exhibiting small differences, such as: triangulate shape basis, with a slight torsion on the apex, in **E. uatuman**. In **E. murinus** the basis of the embolus is more cilindrical, the embolus is thinner and has a torsion on the basis. The seminal receptacula are also very similar.

SYSTEMATIC DISCUSSION

Ephebopus uatuman exhibit the characteristics of the genus *Ephebopus*: first ocular row slightly procurved and the presence of a region of urticating hairs on the inner side of the apex of the palpal femur.

Concerning *E. violaceus* Mello Leitão, 1930 the type seems to be lost. The curator was unable to find it in the Arachnological Collection of the Museu Nacional do Rio de Janeiro.

The genus *Ephebopus* and the species *E. murinus* were unknown by Mello Leitão in 1923. He proposed a modification of Pocock's key from 1901, thus including his new genus *Ancylochiros*. In this work he distinguished the genus *Ephebopus* from *Avicularia* (Lamarck) 1818 mainly by the presence of a division of the posterior scopulae of the tarsi and also by the slightly procurve first ocular row. In *Avicularia* the posterior tarsi has an integral scopulae and the first ocular row is strongly procurve.

In the description of *E. violaceus* the author mentioned a strongly procurve first ocular row and also a division of the posterior tarsal scopulae. We conclude that the specimen of *Ephebopus violaceus* described by Mello Leitão is a juvenile *Avicularia*, because, beside the strongly procurved first ocular row, our experience shows that the division of the tarsal scopulae, and the design present on the dorsal abdominal side are common in young specimens of the genus *Avicularia*.

SciELO

LUCAS, S., SILVA JUNIOR, P.I. da, BERTANI, R. The Brazilian species of the spider genus **Ephebopus** Simon, 1892 (Araneae, Theraposidae, Avicullariinae), with description of **E. Uatuman** n.sp. **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 161-166, 1991

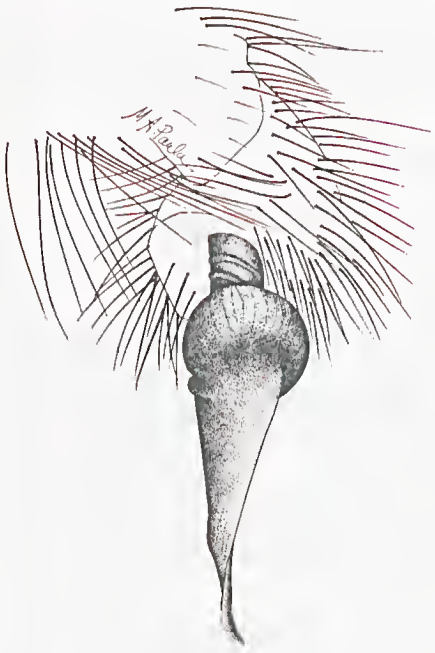
1

2

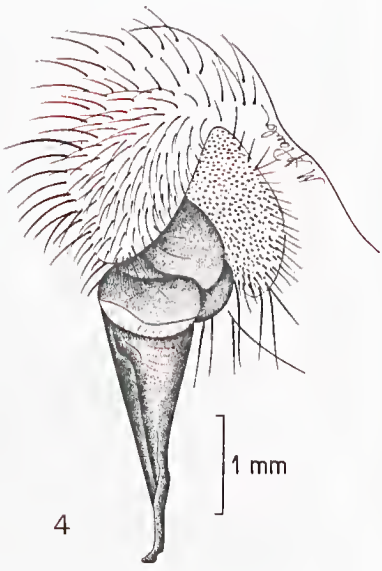
Fig. 1 — 2 *Ephebopus uatuman* n. sp. — 1, male (holotypus); 2, female. (Photos: Giuseppe Puorto)

SciELO

LUCAS, S., SILVA JUNIOR, P.I. da, BERTANI, R. The Brazilian species of the spider genus **Ephebopus** Simon, 1892 (Araneae, Theraposidae, Avicullariinae), with description of **E. Uatuman** n.sp. **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 161-166, 1991



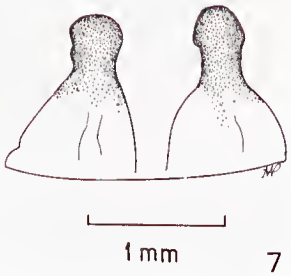
3



4

5

6



7

Fig. 3 — 7 *Ephebopus uatuman* n. sp. — 3, male right palpal bulbus, dorsal view; 4, same, ventral view; 5, male tibial apophysis; 6, urticating hair of type II; 7, receptacula seminalis.

SciELO

CONCLUSION

The genus *Ephebopus* has two valid species described for Brazil: *E. murinus* and *E. uatuman*. *E. violaceus* is transfered to the genus *Avicularia*.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to ELETRONORT for expenses support during our field work.

Resumo: É descrita uma nova espécie do gênero *Ephebopus* Simon, 1892, *E. uatuman*, para região amazônica do Brasil. Quanto à espécie *E. violaceus* Mello Leitão, 1930 o tipo não foi localizado, embora conste dos registros da Coleção Aracnológica do Museu Nacional do Rio de Janeiro, Brasil. O comprimento total do exemplar de apenas 23mm, o desenho no dorso do abdômen e a divisão das escópulas tarsais, citados na descrição muito resumida do autor, fazem-nos concluir tratar-se de um exemplar jovem do gênero *Avicularia*, uma vez que a primeira fila ocular, citada pelo autor como fortemente procurva, é uma característica deste gênero. Portanto, o gênero *Ephebopus* é representado no Brasil por duas espécies: *E. murinus* e *E. uatuman*.

UNITERMOS: Taxonomia. Gênero *Ephebopus* (ARANEAE, THERAPHOSIDAE, AVICULARIINAE) no Brasil: *E. murinus* (Walckenaer), 1837, *E. uatuman* sp. n. *E. violaceus* é sinônimo de *Avicularia violacea*.

REFERENCES

COOKE, J. A. L.; ROTH, V. D.; MILLER, F. M. The urticating hairs of Theraphosidae spiders. *Am. Mus. Novit*, (2498): 1-43, 1972.

LUCAS, S.; SILVA JÚNIOR, P. I. da; BERTANI, R. The genus *Ephebopus* Simon, 1892 (ARANEAE, THERAPHOSIDAE, AVICULARIINAE). Description of the male of *Ephebopus murinus* (Walckenaer), 1837. *Spixiana Zeitsch. Zool.*, *14*(3):245-248, 1991.

MELLO-LEITÃO, C. F. Theraphosoideas do Brasil. *Rev. Mus. Paulista*, (13): 1-438, 1923.

MELLO-LEITÃO, C. F. Aranhas do Cumina. *Arch. Mus. Nac.* Rio de Janeiro, *32*: 51-74, 1930.

POCOCK, R. I. Some new and old genera of Southamerican AVICULARIIDAE. *Ann. Mag. Nat. Hist.* ser 7, *8*: 540-555, 1901

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 53, n. 2, p. 167-173, 1991

ALBINISMO EM SERPENTES NEOTROPICAIS

Ivan SAZIMA *
Marcos DI-BERNARDO **

RESUMO: Albinismo em serpentes neotropicais é brevemente revisto e três adições são feitas: *Helicops modestus, Sibynomorphus neuwiedi* e *Crotalus durissus*. A maioria dos registros sobre serpentes albinas neotropicais é composta por espécies que apresentam hábitos noturnos ou crípticos e algumas são perigosas aos seus predadores potenciais. É feita a suposição de que essa predominância possa ser parcialmente explicada por seleção contra albinismo, em serpentes diurnas, podendo a perda de cores protetivas ser o fator mais importante. Casos adicionais de albinismo, em serpentes tropicais, provavelmente continuarão sendo encontrados principalmente entre espécies noturnas, crípticas, ou aquelas de outro modo protegidas contra predadores visualmente orientados.

UNITERMOS: Anomalias cromáticas, seleção, história natural, serpentes tropicais.

INTRODUÇÃO

As anomalias cromáticas denominadas de albinismo (senso Dyrkacz[12] e Prüst[34]) são conhecidas em diversas classes de vertebrados, incluindo répteis. Albinismo é assunto recorrente na literatura herpetológica, com revisões ou sumários periodicamente disponíveis, em especial para a fauna neártica (e.g. 12, 15, 18). Para a região neotrópica, a maioria dos registros trata de albinismo em serpentes (revisões parciais em Amaral[4], Hoge & Belluomini[21], Miranda et al.[25]).

Apresentamos aqui um sumário sobre albinismo em serpentes neotropicais, incluindo três casos originais. Não pretendemos uma revisão completa da literatura, porém uma idéia da distribuição dessa anomalia em relação aos hábitos (como período de atividade e substrato de caça) de serpentes neotropicais. Com base

* Departamento de Zoologia, Universidade Estadual de Campinas, 13081 Campinas, São Paulo
** Museu de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90620 Porto Alegre, Rio Grande do Sul
Recebido para publicação em 12.4.1991 e aceito em 10.6.1991

SciELO

no sumário, verificamos que albinismo foi registrado principalmente em serpentes noturnas ou crípticas (fossórias ou semifossórias). Prevemos que registros adicionais de albinismo em serpentes tropicais reforcem essa tendência, possivelmente devida à pressão seletiva exercida por predadores diurnos visualmente orientados.

PROCEDIMENTO

No presente estudo consideramos como albinismo as diversas anomalias cromáticas caracterizadas por ausência total ou extensa de melanina, incluídos aí casos de albinismo completo, xantismo, leucismo e piebaldismo[12,34]. Além de casos registrados na literatura, examinamos dois espécimes vivos: um albino completo (senso Dyrkacz[12]) e um xantino (senso Hoge & Belluomini[21]). Incluímos em nosso estudo um albino completo comunicado pessoalmente por Augusto S. Abe (Tabela I) e excluímos o espécime estudado por Amaral[3], por não nos parecer um albino (mesmo no senso amplo).

No sumário dos hábitos das serpentes aqui citadas, usamos registros de literatura (e.g. 6, 10, 11, 37, 43) e observações originais. Ressaltamos a notória dificuldade nas generalizações sobre hábitos de serpentes neotropicais (v. Vanzolini[43]), devido tanto à escassez de informações fidedignas, como à variação sazonal e regional desses hábitos (obs. pess.).

RESULTADOS

Sibynomorphus neuwiedi (Ihering), Colubridae. Um espécime adulto (Figura 1A), c. 30 cm de comprimento total, supostamente provindo da região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, sem outras informações. A coloração geral era rósea, as máculas mais escuras que o fundo. Os olhos eram vermelhos e a língua, rosa-claro. Não sabemos do destino desse exemplar.

Crotalus durissus (L.), Viperidae. Uma fêmea adulta (Figura 1B), com 905 + 65 mm + 10 anéis, procedente de Alfenas, Minas Gerais, em 8.VIII.1987. A coloração geral era amarelada, os losangos mais escuros e tendendo para alaranjado escuro. Os olhos eram castanho-claro e a língua, rosa-escuro. O exemplar está depositado na coleção herpetológica do Instituto Butantan, São Paulo (IB 53456).

Em serpentes neotropicais, anomalias cromáticas do tipo albinismo são conhecidas em cerca de 20 espécies distribuídas em cinco famílias (Tabela I). Excluímos da nossa análise um caso de xantismo em *Pelamis platurus* (L.), serpente pelágica com ampla distribuição nos oceanos Índico e Pacífico[9].

DISCUSSÃO

Uma breve análise dos hábitos das 18 espécies de serpentes neotropicais albinas indica que a maioria apresenta atividade parcial ou basicamente noturna (66.6%, n=12) ou hábitos crípticos (fossório ou semifossório, 22.2%, n = 4). Duas espécies (11.1%) não apresentam nenhuma dessas características, embora as informações sobre *L. anomalus* sejam particularmente deficientes. Vale examinar a predominância de albinismo, em serpentes noturnas ou crípticas, em relação aos hábitos das espécies da região neotrópica.

Das aproximadamente 270 espécies de serpentes registradas para o Brasil[29,44], estimamos que c. 40% apresentem atividade predominantemente no-

SciELO

turna, 30% sejam crípticas e 30% sejam predominantemente diurnas (em boa parte dos gêneros, os hábitos foram inferidos a partir das espécies melhor conhecidas, portanto uma estimativa grosseira). Entretanto, parece-nos plausível sugerir que a predominância de serpentes basicamente noturnas ou crípticas (c. 90%), entre os albinos neotropicais, não esteja vinculada apenas à proporcionalidade desses hábitos. A baixa percentagem de espécies diurnas entre os albinos (11.8%) reforça essa sugestão.

Em serpentes diurnas, as cores e o padrão de coloração podem estar relacionados à defesa contra predadores, disfarce na caça, ou termo-regulação[5,13,16,22,30,31]. A perda das vantagens conferidas pela coloração habitual da espécie parece-nos mais evidente no caso de defesa contra predadores visualmente orientados. Aves diurnas são consideradas como os agentes seletivos mais importantes na evolução dos padrões de coloração de suas presas potenciais (camuflagem, advertência, mimetismo), embora no caso de serpentes as evidências sejam poucas e por vezes inferenciais[16,30,31]. Diversas aves neotropicais incluem, habitual ou esporadicamente, serpentes diurnas na sua dieta (17, 19, 39, 40, 41, 42, 46 e obs. pess.). Assim, a aparente baixa freqüência de albinos entre serpentes neotropicais diurnas, quando comparadas às espécies noturnas ou crípticas, poderia ser devido à maior pressão seletiva de predadores visualmente orientados, como aves (veja discussão semelhante, para peixes neotropicais, em Sazima & Pombal[38]). O aspecto da termo-regulação provavelmente pouco influencia na seleção de albinismo, uma vez que répteis tornados claros e refletivos (por pintura da pele) parecem ser tão eficientes quanto os de coloração normal ou escura[28].

Dos albinos registrados entre serpentes neotropicais, seis espécies (33.3%), além de noturnas ou crípticas, são perigosas para seus predadores potenciais. Quatro delas podem injetar veneno altamente tóxico e duas são fortes constritoras e ágeis mordedoras. Talvez não por coincidência, a cascavel *C. durissus* (noturna, peçonhenta, adverte postural e acusticamente, v. Klauber[23]) seja a espécie com maior número de albinos registrados, cerca de uma dezena (v. Tabela I). É possível que o caráter aposemático da cascavel permita maior sobrevivência de indivíduos albinos. Por outro lado, a cascavel parece ser uma das espécies mais freqüentes, entre as habitualmente recebidas em instituições de estudo das serpentes peçonhentas[7,14,36]. Algumas das espécies aqui tratadas parecem ser muito comuns em certas regiões, porém abundância relativa de per si não parece suficiente para explicar a variada incidência de albinismo, pois em outras espécies tão ou mais comuns não se conhecem albinos. Curiosamente, *Bothrops jararaca* (Wied) parece não se conformar à nossa generalização, pois não se conhecem albinos dessa serpente comum, noturna e perigosa para os seus predadores[36].

Com base no presente estudo, prevemos que casos adicionais de albinismo, em serpentes tropicais, continuem sendo registrados principalmente entre espécies com hábitos noturnos, crípticos, ou de outro modo protegidas contra predadores diurnos e visualmente orientados. Parece-nos plausível sugerir que a predação por aves (visualmente orientadas e predominantemente diurnas) seja um dos principais fatores responsáveis por essa tendência (v. comentários de Vanzolini[42], sobre hábitos noturnos ou crípticos em serpentes de cerrado).

SciELO

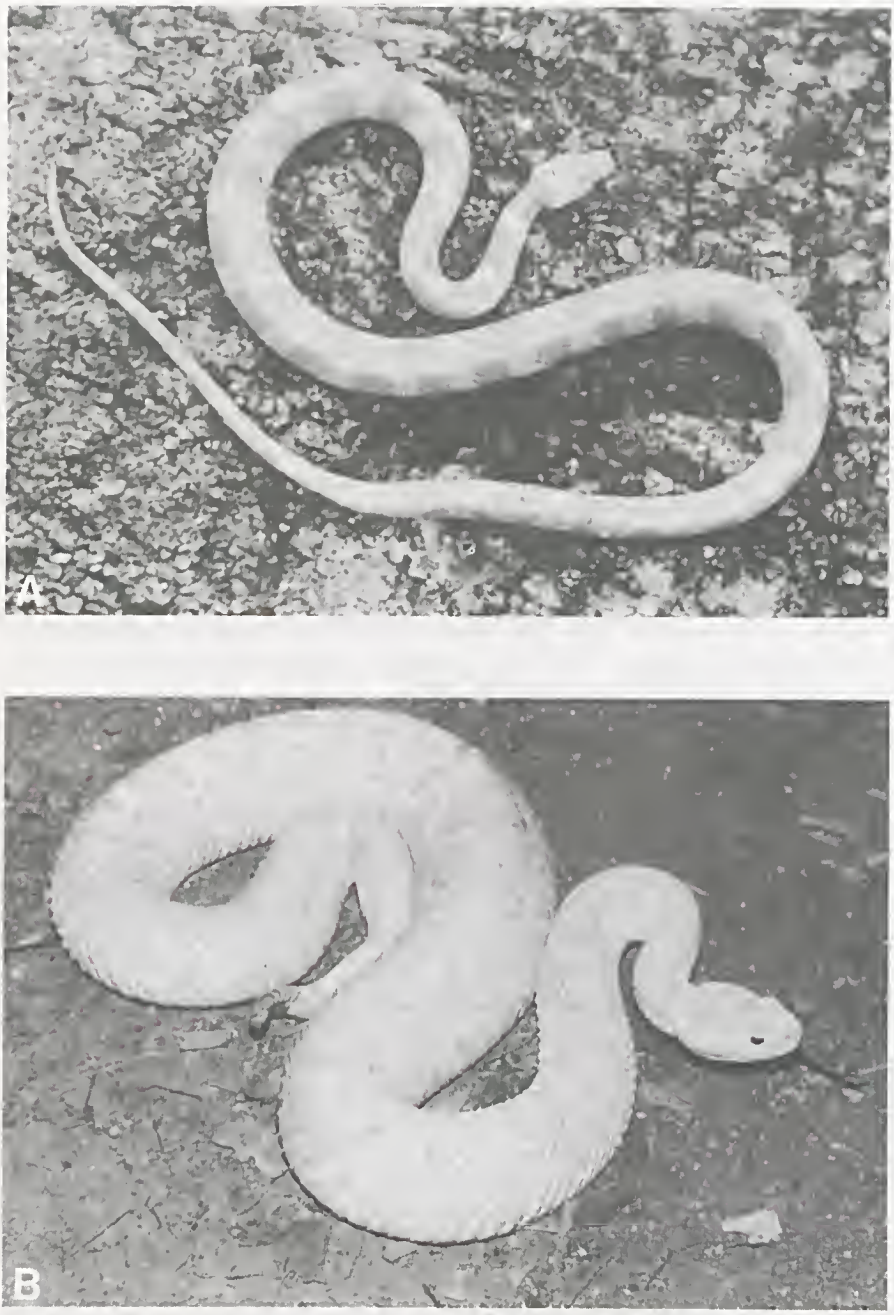


FIG. 1. Albinismo em duas espécies de serpentes brasileiras. A — adulto de *Sibynomorphus neuwiedi*, com ausência total de pigmentação (albino completo); B — fêmea adulta de *Crotalus durissus*, de coloração amarelada e olhos castanhos (xantino).

SciELO

TABELA I
Albinismo (senso Prüst[34]) em diversas serpentes neotropicais.

Espécie	Hábito[A] (substrato)	Atividade[B] (predominante)	Referências (albinismo)
Leptotyphlops munoai	fossório	?	27
Typhlops reticulatus	fossório	?	26
Boa constrictor	terrícola	noturna	45
Epicrates cenchria	terrícola	noturna	21
Helicops modestus	aquático	noturna	A.S.Abe: com.pess.
Liophis anomalus	terrícola	diurna?	25
L. poecilogyrus	terrícola	di/no	24
Leptodeira annulata	subarborícola	noturna	25
Lystrophis dorbignyi	semifossório	diurna	25
Mastigodryas boddaerti	terrícola	diurna	26
Oxyrhopus guibei[C]	terrícola	noturna	1
Pseudoboa nigra[D]	terrícola	noturna	32
Sibynomorphus neuwiedi	terrícola	noturna	presente estudo
S. mikanii[E]	terrícola	noturna	4
Micrurus corallinus	semifossório	di/no	21
Bothrops alternatus	terrícola	noturna	8
B. cotiara	terrícola	noturna	20
Crotalus durissus	terrícola	noturna	2,4,7,20,25,33,35 45, presente estudo

[A]senso Vanzolini 1986a; [B]diversas fontes (veja em ''procedimento''); [C]*O. trigeminus* no original; [D]*P. neuwiedii* no original; [E]*S. turgidus* no original.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos a A.S. Abe por informações sobre o espécime de *Helicops*, bem como pelas críticas e sugestões ao manuscrito; G. Puorto por sugestões e acesso a espécimes da coleção IB (São Paulo); F.L. Franco pela confirmação da identidade dos espécimes de *Sibynomorphus* (incluindo os estudados por A. do Amaral); R.S. Bérnils por informações documentadas; M. Martins e P.S. Oliveira pelas críticas e sugestões ao manuscrito; J. Cavalheiro, P.R. Manzani e S. Moreno, pela ajuda no laboratório; CNPq pelo auxílio financeiro (proc. 300092, I. Sazima).

ABSTRACT: Albinism in neotropical snakes is briefly reviewed and three instances of this color anomaly are added: *Helicops modestus, Sibynomorphus neuwiedi, and Crotalus durissus*. Most neotropical albino snakes are found among species that are either nocturnal or cryptozoic, and some of them are dangerous to potential predators. We suppose that this predominance may partly be explained by selection against albinism among diurnal snakes, and loss of protective colors is possibly the most important single factor. Additional instances of albinism in tropical snakes probably will continue to be found mainly among species with nocturnal or cryptozoic habits, or those otherwise protected against visually hunting predators.

KEYWORDS: Color anomalies, selection, natural history, tropical snakes.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

SAZIMA, I. & DI-BERNARDO, M. Albinismo em serpentes neotropicais. **Mem. Inst. Butantan**, v. 53, n. 2, p. 167-173, 1991

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. Albinismo em "Cobra Coral". *Rev. Mus. Paulista, 15*:3-9, 1927a.
2. AMARAL, A. Da ocorrência de albinismo em Cascavel, *Crotalus terrificus* (Laur.). *Rev. Mus. Paulista, 15*:55-57, 1927b.
3. AMARAL, A. Albinismo em "Dorme-dorme", *Sibynomorphus turgidus* (Cope, 1868). *Rev. Mus. Paulista, 15*:61-62, 1927c.
4. AMARAL, A. Notas sobre chromatismo de ophidios. III. Um caso de xanthismo e um novo de albinismo, observados no Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 8*:151-153, 1933-1934.
5. ANDRÉN, C. & NILSON, G. Reproductive sucess and risk of predation in normal and melanistic colour morphs of the adder, *Vipera berus*. *Biol. J. Linn. Soc. (London), 15*:235-246, 1981.
6. BEEBE, W. Field notes on the snakes of Kartabo, British Guiana, and Caripito, Venezuela. *Zoologica (NY), 31*:11-52, 1946.
7. BÉRNILS, R.S., MOURA-LEITE, J.C., AJUZ, R.G. Albinismo em *Crotalus durissus* (Serpentes: Viperidae) do Estado do Paraná-Brasil. *Biotemas*, 3:129-132, 1990.
8. BUCHERL, W. *Acúleos que matam;* no mundo dos animais peçonhentos. São Paulo, Ed. Melhoramentos, 1971.
9. CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. *The venomous reptiles of Latin America*. Ithaca, Univ. Cornell Press, 1989.
10. CUNHA, O.R. & NASCIMENTO, F.P. Ofídios da Amazônia. X-As cobras da região leste do Pará. *Mus. Para. Emílio Goeldi Publ. Avulsas, 31*:1-218, 1978.
11. DUELLMAN, W.E. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Misc. Publ. Mus. Nat. Hist., Univ. Kansas, 65*:1-352, 1978.
12. DYRKACZ, S. Recent instances of albinism in North American amphibians and reptiles. *Herp. Circular, 11*:1-31, 1981.
13. EDMUNDS, M. *Defense in animals*. Essex, Longman Group, 1974.
14. FONSECA, F. *Animais peçonhentos*. São Paulo, Inst. Butantan, 1949.
15. GILBOA, I. & DOWLING, H.G. A bibliography of albinism in amphibians and reptiles. *HISS Publ. Herp., 6*:1-11, 1974.
16. GREENE, H.W. Antipredator mechanisms in reptiles. In: GANS, C. & HUEY, R.B., ed. *Biology of the Reptilia*. vol. 16. New York, Alan R. Liss, 1988. p. 1-152.
17. HAVERSCHMIDT, F. Notes on the feeding habits and food of some hawks of Surinam. *Condor, 64*:154-158, 1962.
18. HENSLEY, M. Albinism in North American amphibians and reptiles. *Publ. Mus. Mich. State Univ., 1*:133-159, 1959.
19. HILTY, S.L. & BROWN, W.L. *A guide to the birds of Colombia*. Princeton, Princeton Univ. Press, 1986.
20. HOGE, A.R. Herpetologische Notizen. *Mem. Inst. Butantan, 24*:269-270, 1952.
21. HOGE, A.R. & BELLUOMINI, H.E. Aberrações cromáticas em serpentes brasileiras. *Mem. Inst. Butantan, 28*:95-98, 1957/58.
22. JACKSON, J.F., INGRAM III, W.F., CAMPBELL, H.W. The dorsal pigmentation pattern of snakes as an antipredator strategy, a multivariate approach. *Am. Nat., 110*:1029-1053, 1976.
23. KLAUBER, L.M. *Rattlesnakes;* their habits, life histories, and influence on mankind. Berkeley, Univ. California Press, 1956.
24. LEMA, T. Notas sobre os répteis do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. VII. Albinismo parcial em *Leimadophis poecilogyrus pictostriatus* Amaral (Serpentes: Colubridae). *Iheringia (Zool.), 13*:20-27, 1960.
25. MIRANDA, M.E., VALLEJO, M.T., GRISOLIA, C.S. Nota sobre casos de albinismo en ofidios argentinos. *Hist. Nat.* (Corrientes), *5*:121-124, 1985.
26. NICÉFORO-MARIA, Hno. Sección Herpetologia. Reptilia Serpentes. Dos casos de albinismo en los ofidios de Colombia. *Bol. Inst. La Salle* (Bogotá), *45*:1-2, 1958.
27. OREJAS-MIRANDA, B. Observaciones sobre un caso de albinismo de *Leptotyphlops munoai*. *Bol. Soc. Zool. Uruguay, 2*:36, 1972.

SciELO

Errata

Memórias do Instituto Butantan, v.53,2,p 167-173,1991

Sazima,I.& Di-Bernardo,M.-Albinismo em serpentes neotropicais

pag.	linha	onde se lê	leia-se
172	ref. 7	Biotemas	Biotema
173	ref. 36	Ithaca, Cornell Univ. Press, 1991. No prelo	Tyler, Texas, Selva Publ., 1992, p.199-216
173	ref. 37	Edit. Univ.Est.Campinas. No prelo	Edit. UNICAMP & FAPESP, 1992, p.212-236

SciELO

28. PEARSON, O.P. The effect of substrate and of skin color on thermoregulation of a lizard. *Comp. Biochem. Physiol., 58A*:353-358, 1977.
29. PETERS, J.A. & OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of the Neotropical Squamata, Part I. Snakes. *U.S. Nat. Mus. Bull., 297*:1-347, 1970.
30. POUGH, F.H. Mimicry and related phenomena. In: GANS, C. & HUEY, R.B., ed. *Biology of the Reptilia*. vol. 16. New York, Alan R. Liss, 1988a. p. 153-234.
31. POUGH, F. H. Mimicry of vertebrates, are the rules different? *Am. Nat., 131* (suppl): 67-102, 1988b.
32. PRADO, A. Notas ofiológicas. 3. Mais um caso de albinismo em serpente. *Mem. Inst. Butantan, 13*:9-11, 1939.
33. PRADO, A & BARROS, F.P. Notas ofiológicas. 9. Duas cascavéis albinas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 14*: 31-32, 1940.
34. PRüST, E. Albinism in snakes. *Litt. Serp., 4*:6-15, 1984.
35. RENAULT, L. & SCHREIBER, G. Considerações sobre albinismo em cascavel. *Folia Clin. Biol., 16*:91-92; 1949.
36. SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. In: CAMPBELL, J.A., ed. *Biology of pitvipers*. Ithaca, Cornell Univ. Press, 1991. No prelo.
37. SAZIMA, I. & HADDAD, C.F.B. Répteis da Serra do Japi, notas sobre história natural. In: MORELLATO, L.P.C., ed. *História natural da Serra do Japi;* ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil. Campinas, Edit. Univ. Est. Campinas. No prelo.
38. SAZIMA, I. & POMBAL-JR, J.P. Um albino de *Rhamdella minuta*, com notas sobre comportamento (Osteichthyes, Pimelodidae). *Rev. Brasil. Biol., 46*:377-381, 1986.
39. SCHUBART, O., AGUIRRE, A.C., SICK, H. Contribuição para o conhecimento da alimentação das aves brasileiras. *Arq. Zool., S. Paulo, 12*:95-249, 1965.
40. SICK, H. *Ornitologia brasileira;* uma introdução. Brasília, Edit. Univ. Brasília, 1985.
41. SMITH, S.M. Innate recognition of coral snake pattern by a possible avian predator. *Science, 187*:759-760, 1975.
42. VANZOLINI, P.E. Notas sobre os ofídios e lagartos da Cachoeira de Emas, no município de Pirassununga, Estado de São Paulo. *Rev. Brasil. Biol., 8*:377-400, 1948.
43. VANZOLINI, P.E. Levantamento herpetológico da área do Estado de Rondônia sob a influência da rodovia BR-364. *CNPq Relatório de Pesquisa, 1*: 1-50, 1986a.
44. VANZOLINI, P.E. Addenda and corrigenda to the Catalogue of Neotropical Squamata. Smithson. *Herpetol. Inf. Serv., 70*:1-25, 1986b.
45. VILLA, J. & RIVAS, A. Tres serpientes albinas de Nicaragua. *Rev. Biol. Trop., 19*:159-163, 1971.
46. VOOUS, K. Predation potential in birds of prey from Surinam. *Ardea, 57*:117-148, 1969.

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 53, n. 2, p. 175-180, 1991

VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DO LEITE DE COELHA *(Oryctolagus cuniculus)* * *

F. SOGORB S.*
S.B. DAMY *
U.P. RODRIGUES *
L.C.A.G. CHAGURI *

RESUMO: Foi estudada a variação da composição do leite de coelhas reprodutoras Branco Nova Zelândia. Os resultados demonstraram que o teor de proteína do leite não sofreu variação significativa do 5º ao 15º dia de lactação (11,2 g/100ml de leite) e do 16º ao 50º dia (12,4 g/100ml). Os teores de gorduras totais, sódio e potássio foram respectivamente, 13,2 g/100ml, 47,5 mEq/l e 46,6 mEq/l até o 7º dia de lactação; 10,8 g/100ml, 50,8 mEq/l e 50,3 mEq/l entre o 8º e 30º dia; 14,9 g/100ml, 82,3 mEq/l e 23,6 mEq/l entre o 31º e 62º dia, sendo o 2º e 3º períodos, assim como o 1º e 3º, significativamente diferentes. As médias de gorduras totais e de minerais durante todo período de lactação foram: 12,0% de gorduras totais, 60,2 mEq/l de sódio, 40,2 mEq/l de potássio, 343,6 mEq/l de cálcio, 0,52 mEq/l de zinco, 0,056 mEq/l de cobre e 21,3 mEq/l de magnésio.

UNITERMOS: Coelho, leite, proteína, gordura, minerais

INTRODUÇÃO

A composição do leite é fundamentalmente característica da espécie, constituindo uma secreção que difere qualitativa e quantitativamente do sangue. Contém açúcar característico, lactose, e uma proteína típica, caseína. Nos herbívoros, as gorduras contêm grande variedade de ácidos graxos saturados e insaturados[1].

*. Endereço para correspondência:
Instituto Butantan, CP 65, CEP 01051, São Paulo, Brasil.
** Trabalho apresentado no "III Congresso Nacional de la Sociedad Española de Experimentacion Animal (SEEA)." Murcia, Espanha. 1991.
Recebido para publicação em 15.1.1991 e aceito em 5.7.1991

SciELO

Em coelhas a média diária de leite produzido é de 160-200g durante a primeira lactação, aumentando para 170-220g nas subseqüentes[8]. O máximo de produção de leite ocorre na terceira semana após o parto, permanecendo alto na seguinte e caindo na quinta semana. A quantidade produzida durante a lactação depende da dieta, do número de láparos e de fatores genéticos[8].

Secreção e fluxo de leite se relacionam com o ambiente do animal. Em condições naturais a lactação é o resultado de circunstâncias internas e do meio ambiente. Incluem-se entre os agentes operativos os alimentos e detalhes de manejo.

Durante o curso da lactação a composição média do leite varia. Estudos do conteúdo de proteínas, gorduras, lactose e alguns minerais foram registrados por vários autores[1,3,12,15,17,18].

Lactose e sódio são dois dos principais constituintes responsáveis pela manutenção da pressão osmótica do leite, sendo que na coelha existem baixos níveis de lactose compensados por alto teor de sódio[3].

Teores de minerais como cálcio, necessário em diversas funções celulares e tecidos calcificados; magnésio, componente de alguns sistemas enzimáticos, transmissão de impulso nervoso, contração e relaxamento de músculos; zinco, constituinte de várias metaloenzimas, participante do metabolismo e/ou síntese de DNA, RNA e proteínas; cobre, cofator de várias enzimas, como citocromoxidase, tirosinase e amino oxidase, foram objetos de estudos[10,19,20].

O presente trabalho objetiva estudar a composição do leite de coelhas durante a lactação, utilizando reprodutoras de colônia estabelecida há 15 anos, seguindo normas de manejo e alimentação preconizados internacionalmente[8].

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados coelhos da raça Branco Nova Zelândia (BNZ). As fêmeas são utilizadas como reprodutoras na idade de 6 a 24 meses e os machos, desde 9 até 24 meses. De cada fêmea se obtém de 5 a 6 crias. O acasalamento é feito na forma tradicional de levar a fêmea à gaiola do macho, não se praticando o acasalamento entre descendentes de um mesmo casal. Os animais são tatuados nas orelhas para permitir identificar a origem e o seu número como reprodutor. Os reprodutores são alojados em gaiolas individuais de arame galvanizado suspensas. Na metade do período de gestação, a prenhez é comprovada por meio de palpação. Três dias antes do parto é colocado o ninho dentro da gaiola.

Logo após o parto a ninhada é cuidadosamente verificada e são feitos os registros de: data de nascimento e número de láparos. Quando estes completam um mês de idade o ninho é retirado, sendo porém deixado até os quarenta e cinco dias em épocas de muito frio. A ninhada permanece com a mãe até completar dois meses de idade, quando se faz o desmame.

A alimentação consistiu em ração peletizada, balanceada para a espécie, contendo 16% de proteína, fornecida "ad libitum" em comedouro de folha de flandres, mais 100g de Rami per capita/diem.

A hiegienização consistiu em retirada diária dos excretas, lavagem das instalações e desinfecção das gaiolas através de flambagem cada quinze dias.

Para a extração do leite, as coelhas separadas de suas crias desde a véspera, foram ordenhadas por ligeira compressão das mamas. Para se obterem amostras representando a composição média do leite, foram ordenhadas todas as mamas de cada coelha, sendo feitos vários repasses em cada uma delas. O leite foi colhido em tubos de ensaio limpos e secos, transportados imediatamente ao laboratório e homogeneizado dentro do próprio tubo antes de se retirarem as amostras para dosagem.

SciELO

As amostras para determinação de sódio, potássio, cálcio, zinco, cobre e magnésio foram conservadas em congelador (-20°C); nitrogênio e gordura foram dosados logo após a colheita.

MÉTODOS DE DOSAGEM

NITROGÊNIO: método de Kjeldhal.
GORDURAS TOTAIS: método de Van de Kamer modificado[11].
SÓDIO E POTÁSSIO: espectrofotometria de chama (Flame Photometer EEL. Evan Electroselemin Ltd. England).
POTÁSSIO, CÁLCIO, ZINCO, COBRE, MAGNÉSIO: espectrofotometria de absorção atômica.

MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Foram feitas análises de variância, e aplicado o teste de Scheffé[7]. O nível de significância adotado foi o de 5%.

RESULTADOS

O teor de proteína do leite das reprodutoras foi analisado em dois períodos (Tab. 1).

TABELA 1

Teor de proteína do leite de coelha em dois períodos de aleitamento (proteína em g/100ml de leite)

DIAS APÓS PARTO	PERÍODOS	
	5º ao 15º	16º ao 50º
	11,0	11,8
	11,8	10,5
	12,1	11,8
	10,0	10,3
	12,1	13,6
	10,7	13,1
	10,6	13,2
	11,4	15,0
Média	11,2	12,4
± erro padrão	(10,0-12,1)	(10,3-15,0)

Os teores de gorduras totais, sódio e potássio foram analisados em três períodos (Tab. 2).

SciELO

TABELA 2

Média e desvio padrão de gorduras totais, sódio e potássio em leite de coelha, em três períodos de aleitamento

ELEMENTOS		PERÍODOS até 7 dias de lactação	8 a 30 dias de lactação	31 a 62 dias de lactação
GORDURAS TOTAIS (g/100 ml)		13,2 ± 2,5	10,8 ± 1,5	14,9 ± 3,3
SÓDIO*	$\bar{x}$ mEq/l	47,5 ± 7,0	50,8 ± 19,7	82,3 ± 41,9
	$\bar{x}$ mg/l	1.091	1.168	1.893
POTÁSSIO*	$\bar{x}$ mEq/l	46,6 ± 5,6	50,3 ± 9,5	23,6 ± 18,6
	$\bar{x}$ mg/l	1.822	1.967	923

* método: espectrofotometria de chama

A fim de estudar a variação dos elementos do leite apresentados nas tabelas 1 e 2, os valores foram submetidos à análise de variância, aplicando-se o teste de Scheffé[7] para comparação entre as médias, a nível de rejeição de 5%. Obteve-se para proteínas: o primeiro período não diferiu do segundo. Para gorduras totais: o primeiro período (até o 7º dia de aleitamento) não diferiu do segundo (8º ao 30º dia) e do terceiro (31º ao 62º dia). O segundo período diferiu do terceiro. Para sódio e potássio: o primeiro período não diferiu do segundo, porém difere do terceiro. O segundo período diferiu do terceiro.

Os teores médios de gorduras totais, sódio, potássio, cálcio, zinco, cobre e magnésio estudados em amostras coletadas entre o 5º e 62º dia estão ilustrados na tabela 3.

TABELA 3

Teores Médios de Gordura
. Sódio, Potássio, Cálcio, Zinco, Cobre e Magnésio do Leite de Coelha.

GORDURAS TOTAIS %	Na mEq/l	K mEq/l	Ca mEq/l	Zn mEq/l	Cu mEq/l	Mg mEq/l
12,0 (8,8-22,6)	60,2*	40,2* 36,6**	343,6**	0,52**	0,056**	21,3**

* método: espectrofotometria de chama.
** método: espectrofotometria de absorção atômica.

DISCUSSÃO

Os resultados para proteína no leite são semelhantes aos descritos na literatura[1,3,12,15,17,18]

SciELO

A porcentagem de gordura do leite constante da tabela 2 confirma o referido por outros autores[1,3,9,12,15,17,18]. Os valores são mais baixos entre o 8º e 30º dia de lactação, o que está de acordo com o citado na literatura[4]. Esta queda na porcentagem de gordura se deve a um aumento do volume do leite secretado[4,13]; a gordura total secretada é maior quando o fluxo do leite aumenta, embora a concentração de gordura esteja diminuída.[4]

Segundo SAMPIERI[14], nos primeiros quinze dias de aleitamento, a composição em ácidos graxos da gordura do leite de coelha sofre variações pequenas e a relação entre ácidos graxos saturados e insaturados se mantém relativamente constante (1,76 a 1,94). Os ácidos graxos que formam a gordura do leite de coelha não provêm apenas do metabolismo intermediário e dos ácidos graxos pré-formados na ração; quantidades consideráveis de ácidos graxos são, também sintetizados pelas bactérias do ceco e, em seguida, absorvidas[6,16].

Os valores para sódio e potássio apresentados nas tabelas 2 e 3 se aproximam dos dados da literatura[3]. Nota-se que apesar das variações de fluxo acima referidas, os valores para sódio e potássio se mantiveram inalterados até o 30º dia de lactação. Em contraste, durante o 2º mês de lactação, sobem os valores para sódio e baixam os valores para potássio e estas diferenças são significativas. Tais modificações na composição destes eletrólitos refletem, seguramente, modificações nos mecanismos da secreção láctea durante o período de aleitamento[5].

CONCLUSÕES

O teor de proteína do leite de coelha não sofreu variação significativa do 5º ao 15º dia de lactação (11,2 g/100 ml de leite) e 16º ao 50º dia (12,4 g/100 ml). Os teores de gorduras totais, sódio e potássio foram respectivamente: 13,2 g/100 ml, 47,5 mEq/l e 46,6mEq/l até o 7º dia; 10,8 g/100 ml, 30,8 mEq/l e 50,3 mEq/l entre o 8º e 30º dia; 14,9 g/100 ml, 82,3 mEq/l e 26,3 mEq/l entre o 31º e 62º dia, sendo significativa a diferença somente entre o segundo e terceiro período. As médias de gorduras totais e minerais durante todo período de lactação foram: 12,0% de gorduras totais, 60,2 mEq/l de sódio, 40,2 mEq/l de potássio, 343,6 mEq/l de cálcio, 0,52 mEq/l de zinco, 0,056 mEq/l de cobre e 21,3 mEq/l de magnésio.

ABSTRACT: The variation in the composition of rabbit's milk during lactation, was studied in White New Zealand reproducers. The results showed that the milk protein rate did not suffer significant variation from the 5th to the 15th day of lactation (11,2 g/100 ml of milk) and the period between the 16th and 50th day (12,4 g/100 ml). The rates of total fats, sodium and potassium were respectively, 13,2 g/100 ml, 47,5 mEq/l and 46,6 mEq/l up to 7th day of lactation; 10,8 g/100 ml, 30,8 mEq/l and 50,3 mEq/l from the 8th to the 30th day; 14,9 g/100 ml, 82,3 mEq/l and 26,3 mEq/l from the 31st to the 62nd day. The difference was significant between the second and the third period, as well as, the first and third. The rates of total fats and minerals during the lactation consisted of: 12,0% total fats, 60,2 mEq/l sodium, 40,2 mEq/l potassium, 343,6 mEq/l calcium, 0,52 mEq/l zinc, 0,056 mEq/l copper and 21,3 mEq/l magnesium.

KEYWORDS: Rabbit, milk, protein, fat, minerals

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMS, J.T. Nutrición y lactación. *IN*: ABRAMS, J.T. ed., Nutrición animal y dietética veterinária. Zarogoza, Ed. Acribia, 1965, p. 528-560.

SciELO

2. AITKEN, F.C. & WILSON, K.W. *Rabbit feeding for meat and fur.* England, Commonwealth Agriculture Bureaux, Farnham Royal, 8uck, 1962.
3. COATES, M.E.; GREGORY, M.E.; THOMPSON, S.Y. The composition of rabbit's milk. *Brit.J.Nutr.,* 18: 583-586, 1964.
4. COWIE, A.T. Variations in the yield and composition of the milk during lactation in the rabbit and the galactopoietic effect of prolactin. *J. Endocr., 44:* 437-450, 1969.
5. FOLLEY, S.J. & MALPRESS, F.H. Hormonal control of mammary growth. *IN*: PINCUS, G & THIMANN, K.V. eds. *The Hormones,* New York, Academic Press, 1948, p. 695-745.
6. GLASS, R.L.; HEIDI, A.T.; JENNES, R. Comparative biochemical studies of milks. IV. Constituent fatty acids of milk fats. *Comp. Biochem. Physiol., 22*: 415-425, 1967.
7. GRANER, E.A. *Como aprender estatística.* 2ª ed. São Paulo, Melhoramentos, 1968.
8. HAGEN, K.W. Colony husbandry. *IN*: WEIS8ROTH, S.H.; FLATT, R.E.; KRAUS, A.L. eds. *The biology of the laboratory rabbit.* New York, Academic Press, 1974, p. 23-48.
9. HATZFELD, G.H. *Cartilha do criador de coelhos no Brasil.* São Paulo, Chácaras e Quintais, 1950, 120 p.
10. HUNT, C.E. & HARRINGTON, D.D. Nutrition and nutritional diseases of the rabbit. *IN*: WEIS8ROTH, S.H.; FLATT, R.E.; KRAUS, A.L. eds. *The biology of the laboratory rabbit.* New York, Academic Press, 1974, p. 403-428.
11. KAMER, van de J.H.; HUIKINK, H.8.; WEYERS, H.A. Rappid method for the determination of fat in feces. *J.Biol.Chem., 177*: 347-355, 1949.
12. LAM8ERT, L.M. *Modern dairy products.* New York, Chemical Publishing, 1965.
13. LE8AS, F. Mesure quantitative de la prodution laitiere chez la lapine. *Ann. Zootech., 17*(2): 169-182, 1968.
14. SAMPIERI, M.; VALFRE, F.; MALETTO, S. Sulla componente acidica del grasso del latte di coniglia. *Riv. Zoot. Agric. Vet., 7*: 164-172, 1969.
15. SANFORD, J.C. *The domestic rabbit.* London, Crosby, 1957.
16. SMITH, S. & DILS, R. Factors affecting the chain lenghts of fatty acids synthetized by lactating rabbit mammary glands. *Biochem. Byophis. Acta (Amst.), 116*: 26-40, 1966.
17. SPREHN, C. Kañinchen-Krankheiten. 2ª ed. Reutlingen-Oertel Spörer, 1965.
18. TEMPLETON, G.S. *Domestic rabbit production.* 2. ed. Danville, Interstate Printer, 1962.
19. WACKER, W.E. The biochemistry of magnesium. *Ann. N.Y.Acad.Sci., 162*: 717-726, 1969.
.20. WALSER, M. Magnesium metabolism. *Ergeb. Physiol.Biol.Chem.Exp. Pharmacol., 59*: 185-226,1967.

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 53, n. 2, p. 181-190, 1991

DEVELOPMENT OF ANTIBODY RESPONSE AND CLINICAL AND HEMATOLOGICAL ALTERATIONS IN HORSES IMMUNIZED WITH SNAKE VENOMS FOR THE PRODUCTION OF ANTIVENOM IN COSTA RICA

Ricardo ESTRADA
Abel ROBLES
Jorge ALVARADO
Ermila ROJAS
Nuria GONZÁLEZ
Eduardo SEGURA
José Maria GUTIÉRREZ

ABSTRACT: The development of antibody response, as well as the clinical and hematological alterations occurring in horses immunized with snake venoms for the production of polyvalent antivenom in Costa Rica were studied. One horse receiving its first immunization gradually increased antibody response, and underwent an inversion in their albumin/globulin ratio. Neutralizing antibody response in horses that had been previously immunized and received a booster injection of venom showed marked individual variability. Horses injected with booster doses of venom showed increments in total serum proteins and a slight drop in hematocrit and hemoglobin. Regardin clinical alterations after venom injection, there were no signs of systemic alterations (hypotension, hemorrhage, shock), but all horses developed small local lesions at the site of venom injection, characterized by edema, fibrosis and abscesses. These local lesions were treated and healed successfully. At the end of extensive production bleedings, there was a slight drop in hematocrit, whereas in the following weeks there was a conspicuous increase in hematocrit and hemoglobin.

KEYWORDS: Snake venom, antivenom, horses, hematological changes.

Send correspondence to: Dr. Ricardo Estrada; Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiologia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
Recebido para publicação em 05.9.1990 e aceito em 28.2.1991.

SciELO

ESTRADA, R., ROBLES, A., ALVARADO, J., ROJAS, E., GONZÁLEZ, N., SEGURA, E., GUTIÉRREZ, J.M. Development of antibody response and clinical and hematological alterations in horses immunized with snake venoms for the production of antivenom in Costa Rica. **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 181-190, 1991

INTRODUCTION

A polyvalent antivenom is produced in Costa Rica since 1967 for the treatment of pit viper envenomations[1,2]. Horses are immunized with a mixture of equal parts of venoms from *Bothrops asper, Crotalus durissus durissus* and *Lachesis muta*[2]. There is little information in the scientific literature regarding the development of immune response in horses being immunized for the production of antivenoms[4]. In addition, we are not aware of studies on clinical and hematological alterations occurring in horses during immunization with snake venoms.

At the Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica, an individual record is kept on the antibody response as well as in clinical and hematological changes in horses being injected with venoms for the production of the polyvalent (botropic, crotalic and lachetic) antivenom. In this work we present data on a group of horses that had been previously immunized with venom and received booster doses, as well as in one horse being immunized for the first time.

MATERIALS AND METHODS

Horses: Eight healthy adult horses (2-5 years old), from both sexes, weighing between 450 and 500 kg were used in this study. One horse (N° 21) had not been injected previously with venom and was submitted to a first immunization. The other horses (N°s 3, 12, 23, 29, 37, 42 and 44) had been previously immunized and bled, and received booster doses of either 20 or 50 mg of venom. Throughout the study, horses were fed with a combination of king grass, hay and a mixture of powder food reinforced with vitamins and minerals in specific amounts for horses.

Venoms and immunization schedule: Venoms of *Bothrops asper, Crotalus durissus durissus* and *Lachesis muta* were obtained from adult specimens kept at the serpentarium of Instituto Clodomiro Picado. Once collected, venoms were centrifuged at 3000 rpm, frozen and lyophilized. The immunization mixture was prepared by combining equal weights of lyophilized venom from the three species. The venom was dissolved in phosphate-buffered saline solution, pH 7.2, and equal volumes of venom solution and adjuvant (complete Freund, incomplete Freund or sodium alginate) were mixed. Injections were done subcutaneously in the costal arc. Horse N° 21 was immunized according to the protocol described in Table 1. Seven horses (N°s 3, 12, 23, 29, 37, 42 and 44) that had been previously immunized and bled, were injected with a booster dose of venom of either 20 or 50 mg using sodium alginate as adjuvant. This booster injection was administered 40-50 days after the last production bleeding. In all cases, before the addition of adjuvant, venom solutions were sterilized by filtration in nitrocellulose membrane of 0.22 (μ)m.

Production bleeding: Each production bleeding was performed in four days, as follows: Day 1: Eight liters of blood are collected. Day 2: Initially, four liters of blood are collected. Then, sedimented erythrocytes from the blood collected on day 1 are resuspended in 0.15 M NaCl to a volume of four liters; resuspended erythrocytes are then transfused to the same animal. Then, a second bleeding of four liters is performed. Day 3: Initially, four liters of blood are collected. Then, sedimented erytrocytes from the blood collected on the second day are resuspended

SciELO

in 0.15 M NaCl to a volume of four liters; this volume is then transfused to the horse. Day 4: Sedimented erythrocytes from the blood collected on the third day are resuspended in 0.15 M NaCl to a volume of four liters and returned to the horse. Then, 8-12 liters of Ringer's lactate solution are administered. This solution has the following composition: 130 mEq/L sodium, 4 mEq/L potassium, 4mEq/L calcium, 111 mEq/L chloride, and 27 mEq/L lactate.

Antibody response and serum protein concentration: On the days of venom injection, horses were bled from the jugular vein just before venom injection. Blood was allowed to clot at 37°C and serum was collected and used immediately or stored at 4°C. Antibody response against indirect hemolytic activity of *B. asper* venom was assayed by the method of Gutiérrez *et al.*[7] Neutralizing ability of sera was expressed as Effective Dose 50% (ED_{50}), defined as the ratio of (μ)l of serum/mg of venom that reduced hemolytic activity 50%. In order to facilitate data interpretation, neutralizing ability of sera was expressed as $1/ED_{50} \times 10^5$. Besides neutralization tests, total serum protein concentration was determined by a modification of the Biuret method[12], using bovine serum albumin as standard. In addition, albumin concentration was determined by the Bromocresol Green method[12] and the globulin concentration was calculated by subtracting albumin concentration from total protein concentration.

Hematologial changes: On the days of venom injection, horses were bled just before injection, as described above. To prevent clotting, 4% sodium citrate was used as anticoagulant (1 part of anticoagulant per 9 parts of blood). Hematocrit was determined using heparinized capillary tubes[11] and hemoglobin by the cyanomethemoglobin assay[11]. Hematocrit and hemoglobin were also determined during extensive bleeding, in order do detect the effect of acute blood loss. In this case, the Student's *t* test was performed to determine the significance of the differences observed.

Clinical alterations: Clinical examination of horses involved in this study was carried out twice a week and local and systemic alterations were recorded. Local alterations, i.e. pathological changes at the site of venom injection, were observed, especially edema, abscesses, fibrosis and fistules. In addition, sings of systemic poisoning were also followed, in order to detect evidences of hypotension, hemorrhage and cardiovascular shock.

RESULTS

Development of antibody response and changes in serum proteins: Response in horse Nº 21: Fig. 1 shows the development of antibody response, together with changes in serum albumin and globulins, in this horse that received venom injections for the first time. Antibody response peaked around the 100th day, in agreement with previous results[4]. There was and inversion of the albumin: globulin ratio in the course of immunization, correlating with an increase in antibody response (Fig. 1).

Response in horses that had been previously immunized and received a booster injection of venom: Fig. 2 shows a great individual variability in the antibody response after a booster injection of either 20 or 50 mg of venom. In general terms,

SciELO

venom injection elicited an increase in antibody titers. However, the magnitude of this increment varied drastically and, in some cases, there was not an adequate response after venom injection. Some horses (N.ºs 12, 29, 42 and 44) maintained a high antibody titer even 40-50 days after the last venom injection.

Regarding changes in serum protein concentration in these horses, there was an increment in total serum proteins and globulins after venom injection (Fig. 3). This increment was associated with the elevation of antibody titers against indirect hemolytic activity. However, there is not a strict quantitative correlation between these two parameters.

Effect of venom inoculations on hematocrit and hemoglobin: In the majority of studied horses, injection of booster doses of venom (20 or 50 mg) induced a slight reduction in hematocrit and hemoglobin (Fig. 4). Hematocrit reduction after each injection ranged from 3 to 6%.

Effect of extensive production bleeding on hematocrit: Table 2 presents the data on hematocrit variation at different times during these four days of bleeding. At the end of the fourth day, after returning the resuspended erythrocytes but before administering the Ringer's lactate solution, there was a slight decrease in hematocrit, although this drop was not statistically significant ($P > 0.1$). Then, after Ringer's lactate infusion, hematocrit dropped significantly ($P < 0.05$). On the other hand, in the weeks that followed these extensive production bleedings, there was a conspicuous increase in hematocrit and hemoglobin (Fig. 4).

Clinical alterations: No evidences of systemic alterations, i.e. hypotension, hemorrhage, and cardiovascular shock, were observed in the horses used in this study. In contrast, all horses developed local tissue damage at the site of venom inoculation, characterized by edema and fibrosis. In addition, abscesses were observed at the site of injection. Five horses (Nos. 3, 12, 37, 42 and 44) developed fistules at this site. In these cases, topical treatment was performed with antiseptics of external use and healing was successful in all cases.

DISCUSSION

Our results confirmed earlier observations that there is a conspicuous individual variability in the antibody response of horses immunized with snake venoms for the production of antivenoms[4]. The present study extends these findings to horses that had been previously immunized and received booster doses of venom. In the case of *B. asper* venom and antivenom, the study of neutralization of indirect hemolytic activity is a simple and useful parameter to follow the development of antibody response, since there is a good correlation between neutralization of lethality and neutralization of indirect hemolysis[7]. On the basis of the correlation between hemolysis and lethality neutralization, it has been established in our laboratory that hemolysis neutralization titers of 70 correspond to a lethality neutralization titer of 3 mg of venom neutralized per ml of serum.

Drastic variability in antibody response against venom was observed not only between horses but also in the same horse at different times, even when the amount of venom injected was the same. Our results suggest that, in order to increase efficacy in antivenom production centers, it is necessary to evaluate the immune response development individually. *In vitro* assays such as the one used

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

in this work, or others like ELISA[13], might be useful for this individual monitoring.

There was a clear relationship between development of antibody response and some changes in serum protein concentration. After immunization, an increment in total serum proteins took place, as well as in globulins, concomitantly with a reduction in the albumin/globulin ratio. This finding agrees with observations carried out in horses immunized with *Bothrops* venoms in Brazil[3]. These changes are likely to depend on the increment in antibody synthesis in hyperimmunized animals.

Attention was paid to the study of the hematological and clinical alterations in horses as a consequence of venom injection. Only slight changes in hematocrit and hemoglobin were observed even after injections of 20-50 mg venom. In some horses there was a slight drop in these parameters, but no drastic changes were found at any time. These observations correlate with the absence of signs of systemic alterations, probably because these horses had been previously immunized with venoms.

Horses showed signs of local tissue damage at the site of venom injection. The most common findings were edema, abscesses, and fibrosis. Local tissue damage is due to the combined effect of hemorrhagic toxins, edema-forming toxins and myotoxins.[9,10].

Venoms of the three species used for immunization, i.e. *Bothrops asper, Crotalus durissus durissus* and *Lachesis muta*, induce myonecrosis, hemorrhage and edema[5,6]. The formation and extent of local abscesses has been drastically reduced at the Instituto Clodomiro Picado since the introduction of routine filtration of venom solutions prior to immunization. However, small abscesses were observed in these horses, probably due to the local tissue damage induced by venom. Fistules developed in five out of eight horses, and they were successfully treated with topical application of antiseptics.

Another element in the reduction of local lesion intensity in these horses has been the decrease in the amount of venom injected. In the past, booster doses were of 100 mg, whereas current injections are of 20 mg and, exceptionally, of 50 mg. The clinical consequences of this reduction have been evident. Laboratory and clinical observations taken together suggest that horses previously immunized, and injected with booster doses of 20 or 50 mg of venom, undergo only mild pathophysiological alterations. Similar observations were made by Estrada *et al.*[4] in horses being immunized for the first time to produce this antivenom.

Extensive production bleedings have effects on hematocrit and hemoglobin. In order to prevent anemia, sedimented erythrocytes from the previous bleeding are resuspended in saline solution and transfused to horses before the next bleeding. This procedure decreases the extent of hemodynamic alterations in extensive bleeding. In addition, the infusion of Ringer's lactate at the end of bleeding compensates the fluid and eletrolyte deficit caused by plasma depletion and prevents hemoconcentration. No signs of dehydration nor cardiovacular shock are observed in horses used for the production of polyvalent antivenom.

In the weeks that follow a production bleeding, there is a trend to increase hematocrit and hemoglobin, probably as a response to the acute blood loss. Usually, when horses are injected again with the next booster dose of venom, i.e. 40-50 days after bleeding, they have normal hematocrit and hemoglobin and are, therefore, prepared for the next production bleeding. Routine determinations of her-

SciELO

TABLE 1
Immunization schedule used for the production of polyvalent antivenom in horses immunized for the first time.

Day nº	Venom injected (mg)*	Adjuvant
0	0.5	Complete Freund
10	1	Sodium alginate
20	1.5	Sodium alginate
30	3	Sodium alginate
40	5	Sodium alginate
50	10	Sodium alginate
60	15	Sodium alginate
70	30	Incomplete Freund
90	30	Sodium alginate
100	30	Sodium alginate

* Injections are made subcutaneously (see Materials and Methods).

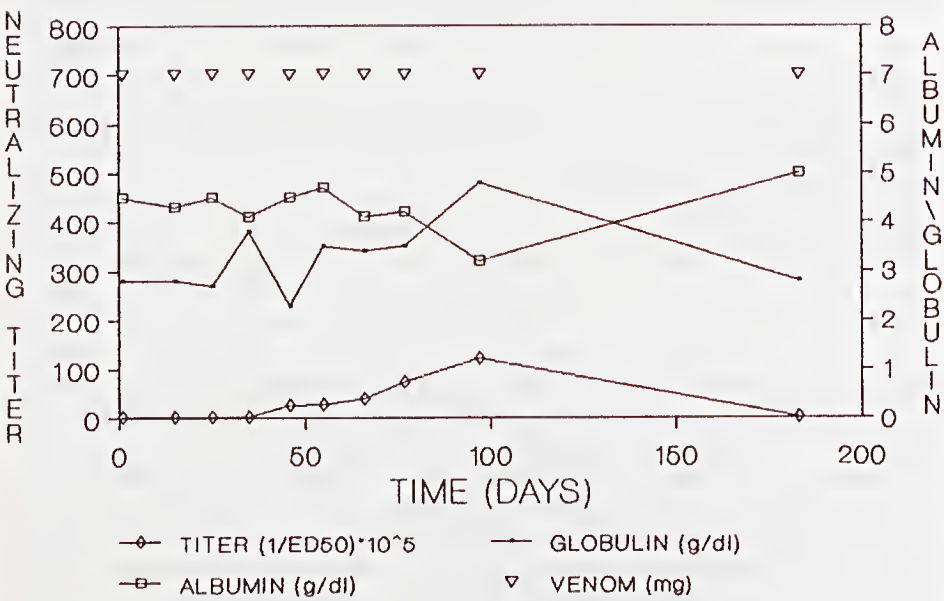


FIG. 1. Development of antibody response against indirect hemolytic activity of *B. asper* venom in horse nº. 21, immunized for the first time. Changes in serum albumin and globulins are also shown. Neutralizing titer is expressed as $1/ED_{50} \times 10^5$ (see Materials and Methods). Triangles (▽) represent venom injections, according to the immunization protocol shown in Table 1.

SciELO

ESTRADA, R., ROBLES, A., ALVARADO, J., ROJAS, E., GONZÁLEZ, N., SEGURA, E., GUTIÉRREZ, J.M. Development of antibody response and clinical and hematological alterations in horses immunized with snake venoms for the production of antivenom in Costa Rica. **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 181-190, 1991

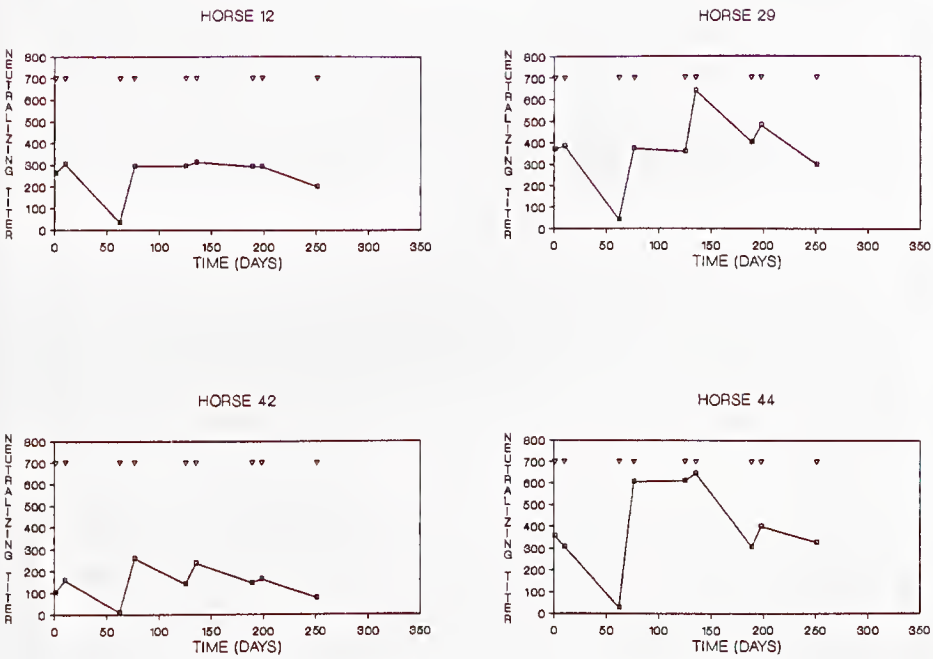


FIG. 2. Changes in neutralizing titer in four horses that had been previously immunized with snake venoms and received booster doses of venom. Neutralizing titer is expressed as $1/ED_{50} \times 10^5$. Triangles (▽) represent injections of 20 mg venom, using sodium alginate as adjuvant.

SciELO

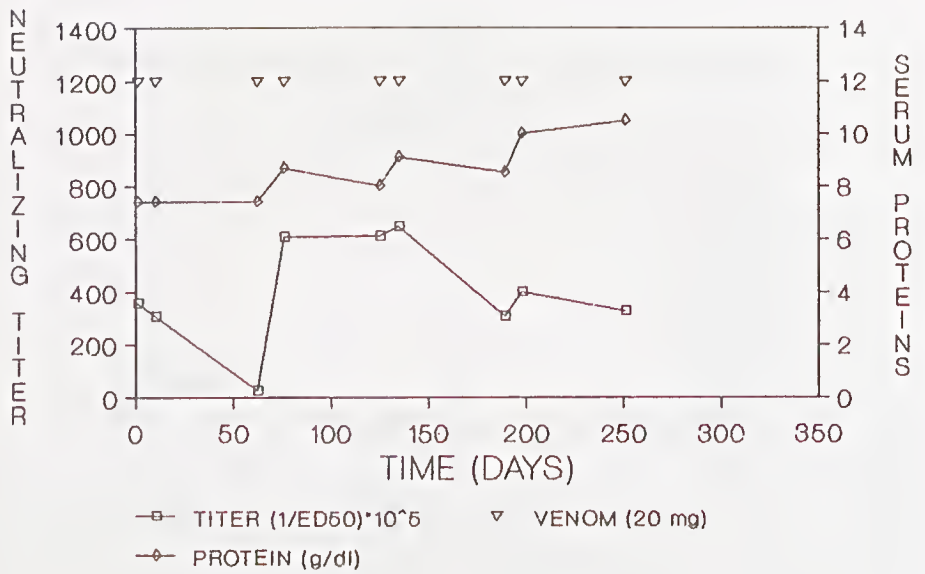


FIG. 3. Changes in neutralizing titer and total serum proteins in horse nº 44 that received booster doses of venom. Neutralizing titer is expressed as $1/ED_{50}$ X 10^5. Triangles (▽) represent injections of 20 mg venom, using sodium alginate as adjuvant.

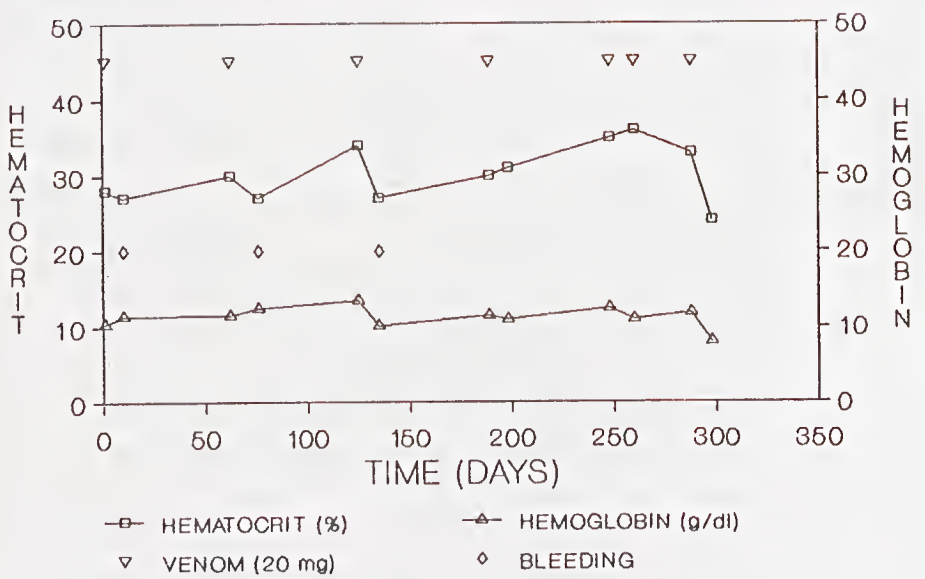


FIG. 4. Changes in hematocrit and hemoglobin in horse nº 37 that received booster doses of venom. Triangles (▽) represent injections of 20 mg of venom, using sodium alginate as adjuvant. Diamonds (◇) represent extensive production bleedings.

SciELO

TABLE 2
Changes in hematocrit in horses during extensive production bleeding*

Day	Hematocrit (%)					
	Before bleeding	After bleeding of 4 liters	Before return of 4 liters	After return of 4 liters	After second bleeding of 4 liter	After Ringers lactate infusion
1	32±3.3**	31±3.0	—	—	31±3.4	—
2	29±3.4	26±1.7	—	30±1.4	31±2.9	—
3	28±3.1	27±2.1	—	30±1.7	—	—
4	—	—	33±2.9	30.2.9	—	25±3.4

* Details of the bleeding protocol are given in Materials and Methods.
**Results are the mean S.D. of four horses.

matocrit, hemoglin, serum protein and neutralizing ability of sera in individual horses is recommended in laboratories devoted to antivenom production.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Bernardo Angulo, Jorge Sanabria, Rodrigo Sanchez, José Joaquim Umanã, Alfredo Vargas, Abel Saborio and Rodrigo Chaves for their collaboration during this study. This project was supported by Vicerrectoria de Investigacion (project 741-89-057) and by International Foundation for Science (project F/0883-3). José Maria Gutiérrez is research fellow of the Costa Rican National Council for Science and Technology (CONICIT).

RESUMO: Foram estudados o desenvolvimento da resposta imunitária e as alterações clínicas e hematológicas que ocorreram em cavalos imunizados com venenos de serpentes, cujos plasmas foram utilizados para a produção de antiveneno polivalente, na Costa Rica. Um cavalo que em sua primeira imunização apresentou um aumento gradual do título de anticorpos, demonstrou uma inversão da proporcionalidade albumina/globulina.

As respostas em anticorpos neutralizantes observadas em cavalos que recebaram dose de reforço de veneno demonstraram marcante variabilidade individual. Em cavalos inoculados com doses de reforço de veneno foi verificado um aumento das proteinas séricas totais e ligeira redução no hemotócrito e da hemoglobina. No que diz respeito às alterações clínicas após a inoculação do veneno, não foram notados sinais de alterações sistêmicas (hipotensão, hemorragia, choque), mas todos os cavalos desenvolveram pequenas lesões locais no ponto de injeção do veneno, caracterizadas por edema, fibrose e abcessos. Estas lesões foram tratadas e cicatrizaram totalmente. Após extensas sangrias para produção houve uma queda ligeira no hematócrito, no entanto, nas semanas seguintes, ocorreram aumentos distintos tanto no hematócrito como da hemoglobina.

UNITERMOS: Veneno de serpentes, antiveneno, cavalos, alteração hematológica

SciELO

ESTRADA, R., ROBLES, A., ALVARADO, J., ROJAS, E., GONZÁLEZ, N., SEGURA, E., GUTIÉRREZ, J.M. Development of antibody response and clinical and hematological alterations in horses immunized with snake venoms for the production of antivenom in Costa Rica. **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 181-190, 1991

REFERENCES

1. BOLAÑOS, R. *Nuevos recursos contra el ofidismo en Centroamérica*. 2. ed. San José, Universidad de Costa Rica, 1971. 29p.
2. BOLAÑOS, R. & CERDAS, L. Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. *Bol. Of. Sanit. Panam., 88*:189-196, 1980.
3. DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, CP.; MORAIS, J.F.; LIMA, M.L.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R.; SANTOS, M.J. Cross reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem. Inst. Butantan, 51*:153-168, 1989.
4. ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J.M.; ALVARADO, J.; ROBLES, A.; AVILA, C., GONZALEZ, N. Desarrollo de la respuesta de anticuerpos anti-fosfolipasa A_2 en caballos inoculados con veneno para la producción de suero antiofídico polivalente en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop., 37*:187-191, 1989.
5. GUTIERREZ, J.M. & CHAVES, F. Efectos proteolítico, hemorrágico y minecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops, Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon, 18*:315-321, 1980.
6. GUTIERREZ, J.M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENE, J.A.; CERDAS, L. Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rica snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comp. Biochem. Physiol.; 85C*:175-179,1986
7. GUTIERREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon, 26*:411-413, 1988.
8. GUTIERREZ, J.M.; CHAVES, F.; ROJAS, E.; ELIZONDO, J.; AVILA, C.; CERDAS, L. Production of monovalent anti-*Bothrops asper*, antivenom; development of immune response in horses and neutralizing ability. *Rev. Biol. Trop., 36*:511-517, 1988.
9. GUTIERREZ, J.M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan, 51*: 211-213, 1989.
10. OWNBY, C.L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: TU, A.T., ed. *Rattlesnake venoms, their action and treatment*. New York, Marcel Dekker, 1982. p. 163-209.
11. SAENZ, G.F.; ALVARADO, M.A.; ATMETLLA, F.; JIMENEZ, R.; ARROYO, G.; VALENCIANO, E. SCHOSINSKY, K. *Hematologia teórico-prática. Morfologia y bioquímica hematológica*. 7 ed. San José, Editorial Universidad de Costa Rica, 1981. p. 491.
12. SCHOSINSKY, K.; VARGAS, M.; VINOCOUR, E.; GONZALEZ, O.M.; BRILLA, E.; GUTIERREZ, A. *Química clínica. Manual de técnicas de laboratório*. 7 ed. San José, Universidad de Costa Rica, 1983. p. 224.
13. THEAKSTON, R.D.G. & REID, H.A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon, 17*:511-515, 1979.

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 53, n. 2, p. 191-195, 1991

NOMENCLATURA EM TOXINOLOGIA. RELAÇÕES COM A COMUNICAÇÃO QUÍMICA ENTRE ORGANISMOS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS TOXINAS.

José Carlos de FREITAS *

RESUMO: É feita um revisão sobre o emprego de vários termos no campo da toxinologia, ressaltando-se suas propriedades farmacológicas e relações biológicas, sobretudo o papel nas comunidades e na evolução. A descrição dos conceitos em toxinologia é uma tentativa de diminuir dúvidas aparentemente ainda existentes entre nós, principalmente em relação aos termos veneno e peçonha.

UNITERMOS: Terminologia toxinológica, venenos, peçonhas.

INTRODUÇÃO

Em todos os níveis da escala filogenética animal encontramos vários exemplos de ataque, defesa e outros comportamentos que dependem de substâncias repelentes, paralisantes ou de outras ações biológicas. Durante os milhões de anos de evolução os organismos desenvolveram um refinamento dessas substâncias para diversas funções, tais como, a captura de presas e as defesas químicas em geral.

FLORKIN[5] denominou os fatores micro ou macromoleculares responsáveis pelas interações químicas de ''ecomônios'' (do grego, ''oikos'', casa, no sentido de habitat e ''horman'', excitar), termo esse, mais tarde, substituído por ''aleloquímicos'' (BROWN *et al*[2]; WHITTAKER & FEENY[22]. Os sinais moleculares que servem às ações intra-específicas, de acordo com KARLSON & LUSCHER[10], constituem os ''feromônios'' (do grego, ''pherein'', transportar) cujos exemplos são conhecidos desde as algas até os primatas, além de ter sido postulado ocorrerem na espécie humana. Um dos mais conhecidos é o feromônio liberado pe-

(*) Instituto de Biociências e Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, CEP 05508, São Paulo, Brasil.
Recebido para publicação em 24.10.1990 e aceito em 05.6.1991

SciELO

las abelhas durante a ferroada sendo responsável pelo recrutamento das outras para picarem o mesmo local o que provoca um ataque maciço (BOCH *et al.*[3]). As ações inter-específicas com vantagens adaptativas para o organismo emissor são realizadas pelos ''alomônios'' (do grego ''allelo'', de um ao outro). Esses incluem uma grande variedade de substâncias repelentes, os venenos e as peçonhas encontradas nas plantas e animais. As ações inter-específicas que conferem vantagem adaptativa para o organismo receptor dependem de ''cairomônios'' (do grego ''kairos'', oportunístico). Nesse caso podemos exemplificar pelos odores de predadores e das presas. O odor de um predador pode provocar reações de escape na presa, o que parece ser não adaptativo. Contudo, BROWN *et al.*[2] ressaltaram que é possível que o cairomônio, agindo sempre na comunidade, seja adaptativo, favorecendo a população como um todo e auxiliando na regulação da dinâmica populacional. Assim, para exemplificar, a saponina esteroídica da estrela do mar *Marthasterias glacialis* desencadeia em sua proximidade a fuga de certos moluscos, o que confere caráter adaptativo a esses últimos (MACKIE[12]). As ações moleculares inter-específicas encontradas nas simbioses são mediadas pelos ''sinomônios'', uma palavra que provém do grego ''syn'', que significa unido, associado (NORDLUND & LEWIS[17]). Um exemplo recentemente descrito na literatura especializada é o da simbiose entre certas anêmonas do mar e o peixe ''palhaço''. Esse peixe reconhece uma substância (anficuemina, um novo composto piridínico) liberado na água do mar pela anêmona, que serve de guia para que o peixe encontre seu hospedeiro (MURATA *et al.*[16]).

Atualmente, consideramos estes sinais moleculares como mais um fator biótico nos ecossistemas e também já conhecemos a estrutura química de um grande número dessas substâncias portadoras de informação. Os recursos defensivos empregados pelos organismos afetam as características físicas e a composição química do meio, de maneira que as diversas ações e reações por sinais químicos são muito importantes na diversificação dos ecossistemas e na evolução das espécies. Assim, em termos energéticos, as toxinas de que se compõe certos sinais químicos retardam o fluxo de energia nos ecossistemas (MARGALEF[13]). A evolução acidental de uma via metabólica resultando, por exemplo, na produção de uma substância nociva para outros membros da comunidade daria uma vantagem seletiva para o clone que adquiriu essa capacidade e o decréscimo da predação sobre esses organismos induziria a um aumento da concentração destes compostos na natureza (KITTREDGE *et al.*[11]). As substâncias defensivas podem atuar sobre outros organismos não só quando são eliminadas no ambiente, mas também quando os seus corpos são lesados ou devorados. Nesses casos, essas substâncias adquirem um papel defensivo ao longo da lenta evolução integradora das comunidades. As toxinas empregadas pelos organismos na defesa química podem afetar outros indivíduos através da dieta ou inoculação por meio de estruturas especializadas. Dependendo da via de transferência (oral ou parenteral) as toxinas podem variar em sua composição química, sítio e modo de ação e, portanto, são classificadas de forma distinta, como é o caso de venenos e peçonhas.

TOXINOLOGIA, VENENOS E PEÇONHAS

RUSSELL[19,20] enfatizou que os animais venenosos ou peçonhentos são encontrados em cada filo, fazendo exceção às Aves nos Vertebrata. As propriedades das toxinas encontradas em ANIMAIS PEÇONHENTOS diferem bastante das toxinas presentes em ANIMAIS VENENOSOS, mesmo em representantes de um mesmo filo. Assim, salienta o autor, não existe relação entre as propriedades quí-

SciELO

micas e farmacológicas da PEÇONHA de raia e do VENENO de baiacu. RUSSELL[19] também empregou os termos: fanerotóxicos para os animais peçonhentos e criptotóxicos para os animais venenosos, embora esta nomenclatura tenha caído em desuso.

Em nossos dicionários os termos ''peçonha'' e ''veneno'', bem como ''secreções peçonhentas'' e ''venenosas'' são consideradas sinônimos. MELLO LEITÃO[15] sugeriu que a confusão existente entre veneno e peçonha nasce da leitura desatenta de livros franceses ou ingleses, traduzindo-se por mera analogia eufônica: ''venin'' por veneno e não por peçonha, como seria correto. Tanto em francês como em inglês ''poison'' é que significa veneno. Por outro lado, VITAL BRAZIL[21] baseando-se em informações de dicionários da língua portuguesa julgou correto o emprego de ''veneno'' aplicado a ''peçonha'' por ter significado abrangente e por sua origem etimológica. Terminologia esta, também adotada por ROSENFELD[12]. De acordo com AMARAL[1], ''... Como, em Lingüística, se estabelece discrime entre veneno e peçonha, reserva-se a veneno o sentido fundamental de substância tóxica que atua mediante inoculação, e a peçonha o conceito essencial de princípio tóxico que age por meio de ingestão''. O autor traduziu o termo ''venenosos'' para o inglês: ''venomous'' e o termo ''peçonhentos'' para o inglês: ''poisonous''. Continua o autor na página 15 de seu livro: Serpentes do Brasil/Iconografia Colorida, ''... A luz destas noções, é de bom aviso, no estudo dos animais dotados de toxicidade, distingui-los em dois grupos: a) nos Venenígeros, se incluem, por exemplo, ... as aranhas, os escorpiões, as vespas etc., mas principalmente todas aquelas serpentes (como no Brasil, a Cascavel, a Urutu, a Surucucu, a Caissaca e a Jararaca) que possuem presas tubulares, prontas para injetar, no ato da picada, o veneno profundamente nos tecidos da vítima; b) os venenosos (ou semivenenígeros), que englobam as serpentes desprovidas de presas capazes de inocular, nos tecidos da vítima, a saliva tóxica (exceto quando conseguem retê-la, mastigando-a ao ponto de inocular-lhe a dita secreção através das punturas que produzem nos tegumentos triturados) antes de a engolir. No caso dos sapos e outros batráquios, cuja secreção tóxica exsuda da pele, a classificação correta exige chamá-los peçonhentos''.

VITAL BRAZIL[21] salientou que ''a palavra peçonha tem significado mais restrito do que veneno'' e que, ''errôneo seria usar 'peçonha' para designar 'veneno' na acepção geral desta palavra'' podendo-se, portanto, considerar peçonha como um tipo de veneno. Assim, na página 1.069 de seu artigo intitulado ''peçonhas'', lê-se: ''A toxicidade da peçonha de Bothrops é considerada menor do que a do veneno da cascavel'' ...As características da peçonha das Bothrops são aquelas assinaladas a propósito do veneno das solenóglifas...''. Entretanto, a meu ver, o uso de ''veneno'' como uma palavra corrente na linguagem do povo brasileiro é correto, mas, na literatura científica, designando a secreção de glândulas especializadas associadas a estruturas inoculadoras, não é adequado.

''Toxinologia'' é a tradução para a língua portuguesa da palavra inglesa ''toxinology'', empregada internacionalmente para designar o estudo de toxinas. O termo ''biotoxins'' empregado por vários autores na literatura toxinológica (ENDEAN[4] HALSTEAD[9], MARTIN & PADILLA[14], FREITAS[6]), foi considerado um pleonasmo pelo Dr. Findlay E. Russell (comunicação pessoal), com o que concordamos plenamente, uma vez que as toxinas só podem provir de seres vivos.

A conceituação de VENENOS e PEÇONHAS aceita internacionalmente considera as propriedades farmacológicas das toxinas integrantes e o tipo de órgão ou tecidos associados. De acordo com FREYVOGEL & PERRET[7], os VENENOS (em inglês ''poisons'') são produtos metabólicos produzidos ou estocados em órgãos que, em condições naturais, afetam o organismo quando ingeridos e po-

SciELO

dem também atuar, de modo artificial, por via parenteral. As peçonhas (em inglês ''venoms'') são originadas em glândulas especializadas associadas a dutos excretores e possuindo ou não, estruturas inoculadoras; geralmente atuam por via parenteral e podem ser destruídas quando ingeridas. Estes autores agruparam os animais venenosos e peçonhentos em quatro categorias:

1) ANIMAIS VENENOSOS PRIMÁRIOS (''PRIMARY POISONOUS ANIMALS''): são aqueles que possuem vias metabólicas para a produção de seus venenos; como exemplo temos o dinoflagelado marinho *Gambierdiscus toxicus* que produz a ciguatoxina (YASUMOTO *et al.*[23]).

2) ANIMAIS VENENOSOS SECUNDÁRIOS (''SECONDARY POISONOUS ANIMALS''): são os que adquirem suas toxinas através da cadeia trófica, alimentando-se de organismos venenosos primários, por exemplo, várias espécies de peixes recebem a ciguatoxina através da dieta de organismos bentônicos marinhos associados ao dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*. Muitos insetos adquirem também suas toxinas através da dieta de plantas tóxicas. Recentemente foi demonstrado que muitos animais que eram considerados venenosos primários, na realidade devem ser considerados secundários (por exemplo: peixes baiacus e crustáceos portadores de tetrodotoxina e saxitoxina) pois suas neurotoxinas têm origem em bactérias associadas a vários tecidos corpóreos (YASUMOTO *et al.*[24]). Mesmo o nosso mexilhão *Perna perna* possui níveis residuais de saxitoxina e goniautoxinas que, possivelmente provém de cepas bacterianas de *Vibrio* e *Pseudomonas* já isoladas de suas glândulas digestivas.

3) ANIMAIS PEÇONHENTOS PASSIVOS (''VENOMOUS DEFENSE ANIMALS''): neste caso, a peçonha está localizada em glândulas cutâneas, sendo utilizada para autodefesa e o aparelho inoculador pode apresentar-se incompleto ou estar ausente. Por exemplo: o peixe escorpião e os anfíbios (HABERMEHL[8], VITAL BRAZIL[21]).

4) ANIMAIS PEÇONHENTOS PREDADORES (''VENOMOUS PREY ANIMALS''): nesta categoria encontramos os animais dotados de estruturas inoculadoras, empregadas, preponderantemente, na captura de presas para alimentação. Por exemplo: ofídios, escorpiões, aranhas, moluscos marinhos da família Conidae, cnidários etc.

Apesar de, popularmente, as toxinas serem denominadas genericamente venenos, no meio científico há necessidade de uma maior coerência no uso de termos, cujo significado está bem estabelecido através da literatura internacional. Na minha opinião, inclusive do ponto de vista didático, existe essa necessidade, recomendando-se designar de peçonha a secreção proveniente de glândulas especializadas, associadas ou não a estruturas inoculadoras e se resguardaria o uso da palavra veneno para as toxinas espalhadas em vários tecidos e/ou órgãos de animais e plantas.

ABSTRACT: The author reviews the terminology in the field of toxinology in attempt to reduce some apparent confusions. The concepts are described focusing on the pharmacological properties, and biological roles with emphasis on the ecosssystem and evolution.

KEYWORDS: Toxin terminology, poison, venom.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. do *Serpentes do Brasil*; iconografia colorida. São Paulo, Melhoramentos; USP; INL, 197 p. 248.

SciELO

2. BROWN JR., W.L.; EISNER, T.; WHITTAKER, R.G. Allomones and kairomones; transpecific chemical messengers. *Biocience, 20*(1): 21-22, 1970.
3. BOCH, R.; SHEARER, D.A.; STONE, B.C. Identification of iso-amyl acetate as an active compound in the sting pheromone in the honey bee. *Nature*, London, *195:*1018-1020, 1962.
4. ENDEAN, R. Marine biotoxins. *In:* FIRTH, F.E. ed. *The encyclopedia of marine resources*. New York, Van Nostrand Reinhold, 1969. p. 61-68.
5. FLORKIN, M. *Aspects moleculaires de l'adaptation et de la phylogenie*. Paris, Masson et. Cie., 1969. 258p
6. FREITAS, J.C. Produtos naturais biologicamente ativos de animais marinhos. Comunicação química e aspectos farmacológicos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45:191-211, 1980/81.*
7. *FREYVOGEL, T.A. & PERRET, B.A.* Notes on toxinology. *Experientia, 29*(11):1317-1452, 1973.
8. HABERMEHL, G.G. Venoms of amphibia. *In*: FLORKIN M. & SCHEER, B.T., ed. *Chemical zoology*. New York, Academic Press., 1974, v.9. p. 161-183.
9. HALSTEAD, B.W. *Poisonous and venomous marine animals of the world*. New Jersey, The Darwin Press, 1988. 2. ed.
10. KARLSON, P. & LUSCHER, M. Pheromones; a new term for a class of biologically active substances. *Nature, 183:*55-56, 1959.
11. KITTREDGE, J.S.; TAKAHASHI, JF. T.; LINDSEY, J.; LASKER, R. Chemical signals in the sea; marine allelochemics and evolution. *Bull. Fish. Wildl. Serv. U.S., 72:*1:12, 1974.
12. MACKIE, A.M. Chemoreception. *In*: MALINS, D.C. & SARGENT, J.R., eds. *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*. New York, Academic Press, 1975, v.2. p. 69-105
13. MARGALEF, R. *Ecologia*. Barcelona, Omega, 1974. 951 p.
14. MARTIN, D.F. & PADILLA, G.M. *Marine Pharmacognosy*; action of marine biotoxins at the cellular level. New York, Academic Press, 1973. 317p.
15. MELLO-LEITÃO, A.G. *Animais Peçonhentos*. Rio de Janeiro, Serviço de Informação Agrícola, 1948. 128p.
16. MURATA, M.; KASUKO, M.; NAKANISHI, K.; NAYA, Y. Characterization of compounds that induces symbiosis between sea-anemone and anemone fish. *Science, 234:*585-587, 1986.
17. NORDLUND, D.A. & LEWIS, W.J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J. Chem. Ecol., 2*(2):211-220, 1976
18. ROSENFELD, G. Animais peçonhentos e tóxicos do Brasil. *In:* LACAZ, C. da S.; BARUZZI, R.G.; SIOUEIRA JR., W., ed. *Introdução à geografia médica do Brasil*. São Paulo, Blucher, p. 430-475.
19. RUSSELL, F.E. Comparative pharmacology of some animal toxins. *Fed. Proc., 26*(4): 1206-1223, 1967.
20. RUSSELL, F.E. Pharmacology of toxins of marine organisms. In: RASKOVA, H., ed. *Pharmacology and toxicology of naturally occurring toxins*. Oxford, Pergamon Press, 1971, v.2. P. 1-114.
21. VITAL-BRAZIL, O. Peçonhas. In: CORBETT, C.E. ed., *Farmacodinâmica*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1982, cap. 71, p. 1044-1074.
22. WHITTAKER, R.H. & FEENY, P.P. Allelochemics; chemical interactions between species. *Science, 171:*757-770, 1971.
23. YASUMOTO, T., INOUE, A., BAGNIS, R., GARCON, M. Ecological survey on a dinoflagellate responsible for the induction of ciguatera. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fis., 45:*395-399, 1979.
24. YASUMOTO, T., NAGAI, H., YASUMURA, D., NICHISHITA, T., ENDO, A., YOTSU, M., KOTAKI, Y. Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin. *In: Tetrodotoxin, Saxitoxin, and the molecular biology of the Sodium Channel*. C.Y. Kao and S.R. Levinson, eds. *Annals of the New York Academy of Sciences, 479:* 44-51, 1986.

SciELO

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 53, n. 2, p. 197-204, 1991

THE NEST AND THE TADPOLE OF *HYLA WAVRINI*, PARKER (AMPHIBIA, ANURA)

Marcio MARTINS*
Gloria MOREIRA**

ABSTRACT: The recently ressurrected *H. wavrini* was observed at several localities in Brazilian Amazonia. Males call in apparent aggregations from the ground to 6 m above ground at the margins of streams, rivers, and lakes in ''igapó'' and ''várzea'' (inundation forests of black and white water, respectively) habitats, apparently throughout the year. At the Reserva Biológica Rio Trombetas, Pará, Brazil, we found that *H. wavrini* builds nests for egg deposition like the other species of the *H. boans* group. The four nests found were less elaborated than those of *H. boans*, *H. faber*, and *H. rosenbergi* and were observed within small pools below trees at the margins of an ''igapó'' lake. Tadpoles leave the nests in five days and larval period is apparently very short, probably related to the high density of predatory fishes in the lake. Tadpoles are similar to those of the other species of the *H. boans* groups, have cryptic coloration, and live in very shallow waters where they hide beneath the detritus layer. An encounter call was emitted by a male when a playback of the advertisement call was played close to it; this and the spacing observed among calling males suggest that *H. wavrini* males are territorial, such as those of the well studied *H. faber* and *H. rosenbergi*. Although sympratic in several Amazonian localities, *H. boans* and *H. wavrini* were never found syntopic probably due to habitat separation (*H. boans* breeds in streams in forests not subjected to seasonal floods).

KEYWORDS: Amphibia, *Hyla wavrini*, reproduction.

* Laboratório de Zoologia, DB/ICB, Universidade do Amazonas, Campus Universitário, 69068 Manaus, AM, Brasil
** Departamento de Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Caixa Postal 478, 69083 Manaus AM, Brasil
Recebido para publicação em 19.2.1991 e aceito em 05.6.1991

SciELO

MARTINS, M. & MOREIRA, G. The nest and the tadpole of *Hyla wavrini*, Parker (Amphibia, Anura). Mem. Inst. Butantan, v. 53, n. 2, p. 197-204, 1991

INTRODUCTION

The *Hyla boans* group (nest building gladiator frogs[11,12]) encompasses large species of *Hyla*, some of them known to construct sand or clay nests where eggs are laid (see brief reviews in [5,11,18,19]). Awaiting a taxonomic revision of the species related to *H. boans* and those of the closely allied *H. circumdata* group, we conservatively consider in the *boans* group only those species known to build nests for egg deposition (see [18,19]).

A large species of the *H. boans* group quite distinct in morphology, calls, and calling habitat from the widespread Amazonian *H. boans* was observed by us in several Amazonian localities in the recent years. This lead us to suspect that this frog was a distinct species. Independently M.S. Hoogmoed (pers. comm.) concluded that these and other specimens from several Amazonian localities were actually *Hyla wavrini* Parker, 1936, and recently resurrected this name[9]. This author distinguished *H. wavrini* from *H. boans* by using several morphological and calling characteristycs (see table 2 in[9]).

Hyla wavrini males call from low perches in "igapó" and "várzea" habitats (see Methods) where they were suspected to reproduce ([9]; pers. obs.). However, Hoogmoed[9] found no nest or egg clutch of *H. wavrini* in several localities he observed calling males, and suggested that "it seems (...) likely that eggs are directly deposited on or in the water"[9]. Recently we found a calling aggregation of *Hyla wavrini* at the Reserva Biológica do Rio Trombetas, Pará, Brazil, where we found egg clutches, nests, and tadpoles of this species. We here present additional observations on calling habitat of *H. wavrini*, describe its nests and tadpoles, and compare them with those of related species.

METHODS

Observations on calling sites of *H. wavrini* were made at several Amazonian localities (table 1), all of them in "igapó" and "várzea" (inundation forests of black and white water, respectively[14]) habitats. Observations and collections at the Reserva Biológica do Rio Trombetas (1°22'S, 56°52' W, elev. ca. 50 m) were made from 27 October to 4 November and 3 and 4 December, 1990. The study site was Lagoinha, a medium sized (ca. 3 ha), shallow "igapó" lake connected to the Rio Trombetas during high waters and becomes isolated during the dry season (August-October); the lake is located about 300 m behind the buildings of the reserve. Observations on nests, tadpoles, and calling males were made in diverse periods of the day (from 0800h to 2200h). We marked the calling sites of 13 males at night and looked for nests and egg clutcthes at these sites by day. In one nest (with eggs deposited in the night of 28/29 October) we collected samples of premetamorphs in 29 and 30 October and 1 November and fixed them in 5% formalin. Eggs and embryos were measured to the nearest 0.1 mm under a dissecting microscope. Tadpoles were collected by day at the margins of the lake and fixed in 5% formalin. To confirm tadpole identification, three individuals in stages 41-43 were mantained in laboratory until metamorphosis. Developmental stages of tadpoles are those of Gosner[8]. Specimens from all localities cited here are deposited in the herpetological collections of Departamento de Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

FIGURE CAPTIONS

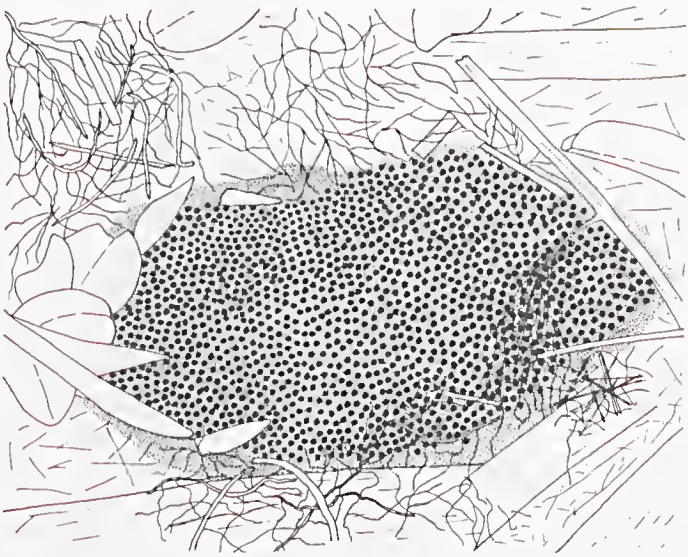


FIG. 1 — Schematic representation of a nest of *Hyla wavrini* (diameter ca. 40 cm) found within roots and leaf litter below an island of "igapó" trees at lake Lagoinha, Reserva Biológica Rio Trombetas, Pará, Brazil. Finely dotted areas represent water; larger dots represent eggs. Drawn after a photograph.

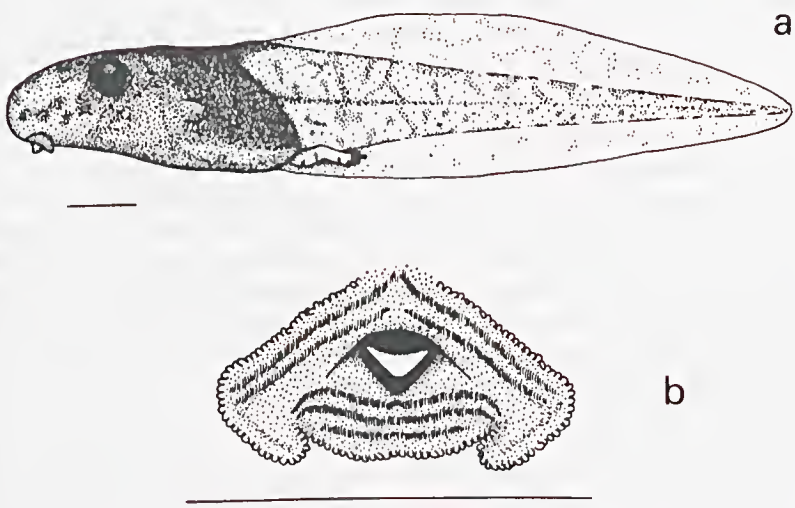


FIG. 2 — Lateral view (a) and mouth (b) of a *Hyla wavrini* tadpole (stage 37) collected at lake Lagoinha, Reserva Biológica Rio Trombetas, Pará, Brazil. Horizontal bars correspond to 3 mm.

SciELO

RESULTS

Males of *H. wavrini* were observed and/or heard calling at several localities in Brazilian Amazonia, from Rio Branco (Amazonas) to Amapá (Table 1); calling activity was observed both in dry and wet seasons (Table 1) throughout this geographical range. In all localities, males called in habitats subjected to seasonal floods (lakes, rivers, and streams in "igapó" and "várzea"). Densities of calling males seem to be higher in lakes than in rivers or streams.

During our stay at the Rio Trombetas, *Hyla wavrini* males called all nights. Calling activity began at 1730h (ca. 30min before dusk) on most evenings and, after a peak at approximately 1900-2000h, dirninished through the night. Males called at 80-90 calls per minute, although some of them emitted very long and spaced calls in the evening hours. Males called from the ground (over leaf litter or partially submerged in shallow small pools) to 6 m above ground (on branches of "igapó" trees) nearly regularly spaced in apparent aggregations throughout "igapó" margins; some areas where calling males were absent were nearly identical to those where males aggregated. In these apparent aggregations, distances between calling males varied from approx. 4-15 m, although in 3 November two males called 1.5 m apart for some 30 min until one of them moved away. When calling close to each other, males alternated their calls. In 31 November we recorded a long series of the advertisement call of a male and made playbacks some 2 m from the same. At the first playback the male immediately emited a series of 35 encounter calls (Wells, 1977) with shorter and, apparently, lower pitched notes than those of the advertisement call. Further playbacks to this and another male failed to elicit responses other than call alternation.

On 1st November, of thirteen calling sites marked in the previous nights, 10 had calling males (probably the same individuals) and three were vacant; furthermore one male was calling in a site where no male called in the previous nights.

We found four nests (hereafter numbered 1-4 according to day of first observation) with pre-metamorphs of *H. wavrini* at calling sites marked in previous nights (besides these, an aditional depression very similar to a nest was found at a calling site). All nests found were water filled, roughly round depressions (Fig. 1) with diameters of about 30—50 cm, located within shallow irregular pools in small islands of "igapó" vegetation. Nests nos. 1 and 4 were found in 29 October and 4 November, respectively, in a site where a male called throughout the observation period. Nest no. 4 was about 1m from nest no. 1. Nest no. 1 was located in the leaf litter-water interface, had a water surface of 54x37 cm, and was some 4 cm deep; nest limits were easily noted by rough walls of mud leaf litter. Nest no. 4 was located within partially submerged roots of an "igapó" tree and was limited by the roots and by leaf litter (Fig. 1). When found, nests nos. 1 and 4 had eggs and embryos in stages 10-11 and 17-18, respectively. Nests nos. 2 and 3 were found in 1 and 3 November, respectively, in a site where a male called also throughout the observations. Nest no. 3 was nearly 2.5 m from nest no. 2. They were both located in the leaf litter whithin irregularly shaped depressions and had almost no walls in their limits. When found, both nests nos. 2 and 3 had embryos in stages 21-23. In 3 November we found a water filled depression that was very similar to the nests above: a round ca. 40 cm diameter depression limi-

SciELO

ted by muddy and leaf litter walls (some 1-2 cm high) located in the leaf litter--water interface. A tadpole of *H. wavrini* (ca. 30 mm) in stage 25 was found in this nest.

We did not counted eggs in clutches of *H. wavrini* during our stay at Trombetas. However the clutches of *H. wavrini* observed had evidently more eggs than those of *H. faber* (range 1614-3576 eggs, x = 2276 eggs[18]). Eggs are black and surrounded by two transparent jelly-like capsules. Diameter of external capsules, internal capsules, and eggs were 3.2-3.5 mm, 2.2-2.4 mm, and 1.6-1.8 mm, respectively. Eggs are deposited as a roughly round monolayer film on the water surface and are hold together by their sticky capsules. Supposing that eggs are deposited arround 0300h (the mean time of egg deposition in the related *H. rosenbergi*[12]), embryos collected in a clutch of 28/29 October (nest no. 1) were in stages 18-19 (4.5-4.9 mm) in ca. 40 h and in stages 23-24 (8.2-9.2 mm) in ca. 90 h. In 3 October, all tadpoles had abandoned nest no. 1. A nest found in 4 December 1990 had 1056 embryos in stages 20-22, one tadpole in stage 25 (ca. 25 mm), and five freshwater shrimps.

Tadpoles of *H. wavrini* were found in shallow small pools and abandoned nests within the islands of ''igapó'' trees and in the margins of a sandy beach at the lake. At the sand beach, individuals of diverse sizes (10-35 mm) and stages (25-42) flushed from under a detritus layer at the shallows (1-2 cm) as an observer walked near the margins; after swimming a few centimeters these tadpoles retreated under debris or stopped unretreated. Dorsal coloration in cryptic and tadpoles are hardly found when immobile on the bottom.

The following description is based on a ''typical'' tadpole (INPA 1371, collected at Lagoinha, Rio Trombetas, Pará, Brazil, in 30 November 1990) in developmental stage 37. Body length 12.7 mm; total length 34.7 mm; body in dorsal view ovoid, wider (8.1 mm) posteriorly; body in lateral view elongate, dorsoventrally depressed, slightly deeper (5.3 mm) posteriorly, throat concave; snout in dorsal view rounded, in lateral view slightly truncate; eyes large, dorsolateral, facing laterally; distance between eyes 2.8 mm, from eye to nostril 0.9 mm; eye diameter (2.1 mm) slightly greater than the distance between nostrils; spiracle sinistral, its opening on midline (Fig. 2a); cloacal tube short, conical. Caudal musculature moderately robust, gradually tapering to round tip; deepest point of tail 6.1 mm; dorsal fin originating on body, deeper at midlength of tail; ventral fin deeper at midlength of tail; depth of dorsal fin slightly greater than caudal musculature at midlength of tail; depth of ventral fin similar to caudal musculature at midlength of tail (Fig. 2a). Mouth medium sized, ventro-terminal; well developed lips, upper and lower lips with one row of small papillae; lower lip with symmetrical folds; upper and lower beaks narrow, finely serrate; lower beak V-shaped; two rows of denticles on the upper lip, the outermost continuous and the innermost interrupted at the middle; three continuous rows of denticles on the lower lip (Fig. 2b). In preservative the dorsum is brownish tan with darker reticulation; throat and anterior part of belly like dorsum, posterior part of belly whitish, slightly translucid; caudal musculature and fins cream with irregular brown reticulation. In life the body, caudal musculature, and fins are a little greenish.

Three metamorphosing tadpoles (stages 43-45) had snout-vent length (SVL) of 14, 15, and 17 mm. Recently metamorphosed *H. wavrini* has a brown dorsum very similar to the colors of adults.

SciELO

TABLE 1

Localities and dates of observations on calling activity of *Hyla wavrini* males. The driest months of each locality are indicated.

Locality	Date	Driest months
Rio Branco near mouth, Amazonas (AM)	08 Jun 1989	Aug-Sep
Paraná Amajaú, AM	10 Jun 1989	Aug-Sep
Rio Jauaperi, AM	07 Jun 1989	Aug-Sep
Anavilhanas, Rio Negro, AM	22-24 Mar 1988	Jun-Oct
Rio Cuieiras, AM	10 Aug 1986	Jun-Oct
Manaus, AM	20 Nov 1990	Jun-Oct
Rio Trombetas, Pará (PA)	27 Oct to 04 Dec 1990	Aug-Oct
Alter do Chão, PA	17 Sep and 29 Nov 1988	Aug-Oct
Igarapé do Bispo, Amapá	22 Jul 1989	Sep-Nov

DISCUSSION

Hyla wavrini is widespread in northern Amazonia, occurring from Taracuá, Rio Uaupés, Amazonas[9], throughout the Amazon Basin, reaching Igarapé do Bispo, just south of Macapá, Amapá (pers. obs.). At the present state of knowledge, its range seems to be within that of *H. boans* (see fig. 1 in[9]) which occurs in southern Central America and throughout Amazonia. In fact, both species are sympatric at several Amazonian localities ([9]; pers. obs.), although they were never found to be syntopic. *Hyla boans breeds in ''terra firme'' (forests not subject to inundations)* streams while *H. wavrini* breeds at lakes, streams, and rivers in ''igapó'' and ''várzea'' habitats. This habitat separation may prevent syntopy and, consequently, hybridization. Another difference between these two related species is that *H. boans* breeds during the dry season ([22]; pers. obs.) while *H. wavrini* seems to breed both in the dry and wet seasons (this study).

The spacing observed among calling males, their apparent fidelity to calling sites, and the presence of an encounter call in the vocal repertoire indicate that *H. wavrini* males are territorial. Hoogmoed[9] observed scars, probably caused by prepollical spines, in the dorsum of a male *H. wavrini* and speculated that males of this species may fight as in *H. faber* and *H. rosenbergi*, the only two well studied species of the *boans* group[12,16,18,19]. Thus, as for nest building behavior, fighting behavior may be widespread in the *boans* group; suggestively, Kluge[11,12] treats the *H. boans* group as ''nest building gladiator frogs''.

The habit of building nests for egg deposition was observed in *H. biobeba*[10], *H. boans*[3,4,5,13], *H. faber*[7,15,17,18,19], *H. pardalis*[16], *H. rosenbergi*[12], and *H. wavrini* (this study). The nests of *H. wavrini* described herein have walls less elaborated than those of *H. boans (pers. obs.), H. faber* (e.g., fig. 6 in[19], and *H. rosenbergi* (e.g., fig. 27 in[12]). However, Kluge[12] and Martins[18] suggest that the material used to build nests and, consequently, their architecture, in *H. rosenbergi* and *H. faber*, respectively, is related to the nature and hardness of the substrate (e.g., some *H. faber* males build nests just by pushing away the aquatic vegetation in pond margins[18]).

The developmental rate of *H. wavrini* initial premetamorphic stages observed at Trombetas is faster than those observed by Martins[18] for *H. faber* and by Kluge[12] for *H. rosenbergi*. Furthermore, metamorphosing young *H. wavrini* (SVL

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

14-17 mm) are smaller than those of *H. rosenbergi* (SVL 19-22 mm) and *H. faber* (SVL 31-37 mm). These differences suggest that total developmental period of *H. wavrini* is shorter than those of the latter species (40 days in *H. rosenbergi* [12]; 8-9 months in *H. faber* [18]). Rapid developmental period may increase the probability of tadpoles escaping predation and/or water drying in temporary ponds, but in permanent ponds it may also permit escape from large predators[21]. We observed high density of fishes at Lagoinha (probably because of the low waters, see[20]). Short developmental period associated with the defensive tactics (crypsis, hiding behaviour, and preference for very shallow water) observed in *H. wavrini* tadpoles may reflect the high density of predators in the habitats where tadpoles grow.

In general, the tadpoles of *Hyla wavrini* are similar to those known for the other members of the *boans* group. Major differences for tadpoles in similar stages are the following: the tadpoles of *H. biobeba* are larger (66 mm in stage 37[2]), have two rows of papillae bordering upper and lower lips, and no fold and four rows of denticles in the lower lip, the innermost interrupted at midlength; the tadpoles of *H. boans* are slightly larger (43 mm in stage 38[6]) and have four rows of denticles in the lower lip; those of *H. faber* are larger (80 mm in stage 37[18]); those of *H. pardalis* are slightly larger (43 mm in stage 38[1]), have no row of papillae in the upper lip, and the innermost row of denticles in the lower lip is interrupted at midlength; and those of *H. rosenbergi* have four rows of denticles in the lower lip.

Additional observations on the reproductive biology of *H. wavrini* and *H. boans*, ideally at localities where the two species are sympatric (see[9]), would clarify how these two closely related species face the constraints associated to their different breeding habitats (inundation forests and streams in ''terra firme'', respectively).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Silvia Egler, Marcelo Gordo, Célio Haddad, and J. P. Pombal Jr. for helpful suggestions on earlier drafts of the manuscript; IBAMA for permission to work at Trombetas; and CNPq for financial support to M. Martins.

RESUMO. *Hyla wavrini*, espécie recém-revalidada, foi observada em diversas localidades da Amazônia brasileira. Machos cantam em aparentes agregações, do chão até 6 m de altura, em margens de riachos, rios e lagos em ambientes de igapó e várzea (florestas inundáveis de água preta e água branca, respectivamente), aparentemente durante todo o ano. Na Reserva Biológica Rio Trombetas, Pará, Brasil, observamos que *H. wavrini* constrói ninhos para a desova, como as outras espécies do grupo *H. boans*. Quatro ninhos encontrados eram menos elaborados que aqueles de *H. boans*, *H. faber* e *H. rosenbergi* e estavam entre pequenas poças sob árvores nas margens de um lago de igapó. Os girinos abandonam os ninhos em cerca de cinco dias e o período larvário é aparentemente muito breve, provavelmente devido à grande densidade de peixes predadores no lago. Os girinos são semelhantes àqueles das outras espécies do grupo *H. boans*, têm coloração críptica e vivem em águas muito rasas onde se escondem sob uma camada de detritos. Um ''grito de encontro'' foi emitido por um macho quando um ''playback'' do canto de advertência foi tocado próximo a ele; este fato e o espaçamento observado entre machos que cantavam sugerem que machos de *H. wavrini* são territoriais, como em duas espécies próximas,

SciELO

bem estudadas, *H. faber* e *H. rosenbergi*. Embora simpátricas em diversas localidades da Amazônia, *H. boans* e *H. wavrini* não foram encontradas em sintopia, provavelmente devido à separação por habitats (*H. boans* reproduz-se em riachos de florestas não sujeitas a inundações periódicas).

UNITERMOS: Amphibia, *H. wavrini*: reprodução.

REFERENCES

1. BOKERMANN, W. C. A. Observações sobre *"Hyla pardalis"* Spix (Anura, Hylidae). *Rev. bras. Biol., 28*:1-5, 1968.
2. BOKERMANN, W. C. A. & SAZIMA, I. Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 1 — Espécies novas de *"Hyla"* (Anura, Hylidae). *Rev. bras. Biol., 33*:329-336, 1973.
3. CRUMP, M. L. Reproductive strategies in a tropical anuran community. *Misc. Publ. Mus. Nat. Hist. Univ. Kans., 1*:1-68, 1974.
4. DUELLMAN, W. E. The hylid frogs of Middle America. *Mus. Nat. Hist. Univ. Kans. Monogr., 1*:1-753, 1970.
5. DUELLMAN, W. E. Nest building hylid frogs. *HISS News-J., 1*:72-75, 1973.
6. DUELLMAN, W. E. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Misc. Publ. Mus. Nat. Hist. Univ. Kans., 65*:1-352, 1978.
7. GOELDI, E. A. Contributions to the knowledge of the breeding habits of some frogs (Hylidae) of the Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brazil. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, p. 89-97, 1895.
8. GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica, 16*:183-190, 1960.
9. HOOGMOED, M. S. Ressurrection of *Hyla wavrini* Parker (Amphibia: Anura: Hylidae), a gladiator frog from northern South America. *Zool. Meded., 64*:71-93, 1990.
10. JIM, J. Aspectos ecológicos dos anfíbios registrados na região de Botucatu, São Paulo (Amphibia, Anura). São Paulo, 1980. [Tese de Doutoramento — Universidade de São Paulo.]
11. KLUGE, A. G. The gladiator frogs of Middle America and Colombia; a reevaluation of their systematics (Anura: Hylidae). *Occas. pap. Mus. Zool. Univ. Mich., 688*:1-24, 1979.
12. KLUGE, A. G. The life history, social organization, and parental behavior of *Hyla rosenbergi* Boulenger, a nest building gladiator frog. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich., 160*:1-170, 1981.
13. LAMOTTE, M. & LESCURE, J. Tendances adaptatives a l'affranchisement du milieu aquatique chez les amphibiens anoures. *Terre Vie, 31*:225-311, 1977.
14. LEOPOLDO, P. R.; FRANKEN, W.; SALATI, E.; RIBEIRO, M. N. Towards a water balance in the central Amazonian region. *Experientia, 43*:222-233, 1987.
15. LUTZ, B. Fighting and an incipient notion of territory in male tree frogs. *Copeia*, p. 61-63, 1960.
16. LUTZ, B. The clay nests of *Hyla pardalis* Spix. *Copeia*, p. 364-366, 1960.
17. LUTZ, B. *Brazilian species of Hyla*. Austin, University of Texas, 1973. 290p.
18. MARTINS, M. História natural do Sapo Ferreiro (*Hyla faber* Wied) na região de Campinas, Estado de São Paulo. Campinas, 1990. [Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas.] 140p.
19. MARTINS, M. & HADDAD, C. F. B. Vocalizations and reproductive behaviour in the Smith Frog, *Hyla faber* Wied (Amphibia: Hylidae). *Amphib.-Reptilia, 9*:49-60, 1988.
20. SAZIMA, I. & POMBAL JR., J. P. Mutilação de nadadeiras em acarás, *Geophagus brasiliensis*, por piranhas, *Serrasalmus spilopleura*. *Rev. bras. Biol., 48*:477-483, 1988.
21. WILBUR, H. M. Complex life cycles and community organization in amphibians. In: PRICE, P. W., SLOBODCHIKOFF, C. N., GAUD, W. S. *A new ecology*; novel approaches to interactive systems. New York, John Wiley, 1984. p. 195-224.
22. ZIMMERMAN, B. L. & BOGART, J. P. Vocalizations of primary forest frog species in the central Amazon. *Acta Amazonica, 14*:473-519, 1984.

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 53, n. 2, p. 205-210, 1991

INFLUENCIA DEL AYUNO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE VENENO EN *BOTHROPS ALTERNATUS* (OPHIDIA: VIPERIDAE: CROTALINAE)

F. FRANCINI*
F. O. PELUSO*
C. S. GRISOLIA*

RESUMEN: el presente trabajo tiene por objeto dar a conocer los resultados referentes a la influencia del ayuno sobre la producción de veneno en *Bothrops alternatus* en cautiverio. A través del análisis de varianza y la prueba de significación de la diferencia entre dos medias por el método del error standard, se encontraron diferencias estadisticamente significativas en muestras de 0 a 45 días y de 46 a 90 días de ayuno con respecto a la cantidad de veneno seco obtenido, un 42% mayor en la segunda muestra. Por otro lado, se halló correlación positiva de 0,4 entre la cantidad de días de ayuno y la cantidad de veneno seco extraida.

PALABRAS CLAVE: Bothrops alternatus, ayuno, producción veneno.

INTRODUCCIÓN

Una de las finalidades del Laboratorio y Museo de Animales Venenosos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, es la obtención de antígenos para la elaboración de sueros específicos. La extracción de veneno se realiza en forma periódica de acuerdo a las técnicas y necesidades de cada laboratorio productor[2,4,5,8,12,15,20,23]. En nuestro caso, debido a la exigua cantidad de ejemplares que ingresan anualmente al bioterio, aproximadamente 10 individuos por año para *Bothrops alternatus*, es fundamental maximizar la pro-

* Laboratorio y Museo de Animales Venenosos
Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata
Calles 60 y 120 - 1900 - La Plata - Argentina.
Recebido para publicação em 20.5.1991 e aceito em 9.10.1991

SciELO

ducción reduciendo al mínimo la mortalidad de los animales. Una causa importante de ésta, es el stress que ocaciona la extracción de veneno, tanto mayor cuanto más frecuentemente sean sometidos los individuos a la misma. Por ello, hemos ensayado diferentes cronogramas de extracción con el fin de lograr la mayor cantidad de antígeno con el menor manipuleo posible de los ofidios. Se debe destacar que el ayuno previo a la extracción es otra variable que hemos investigado para lograr esa meta.

Si bien el manual de la OPS/OMS[18] informa que no existiría incidencia importante del ayuno en la cantidad de veneno obtenida, en otro trabajo[11] se estudió el efecto de la supresión de la alimentación sobre la cantidad de veneno en *Crotalus durissus terrificus* encontrándose incidencia positiva del ayuno sobre la producción. El presente trabajo tiene por objeto investigar si existe esta relación en *Bothrops alternatus*.

MATERIAL Y METODO

Se trabajó con lotes de 20 ejemplares de *B. alternatus* para cada extracción, de diferente sexo y edad, durante un período de 8 años (1982 a 1990).

Los adultos fueron alojados en forma individual en cajas de acrílico transparente de 50 x 50 x 18 cm, con tapa corrediza de alambre tejido, mientras que los viboreznos en cajas de madera de 30 x 30 x 15 cm, con tapa corrediza de vidrio y pared frontal de alambre tejido. Todas las cajas poseían una capa de viruta de madera de 3cm de alto, la cual era renovada cada 45 días y un recipiente plástico con agua en forma permanente. La alimentación consistió en ratones *(Mus musculus)* ofrecidos vivos una vez a la semana.

El bioterio se mantuvo en un rango de temperatura entre 20°C y 25°C con una humedad promedio del 70% e iluminado con luz natural.

Las extracciones de veneno se realizaron, en todas las oportunidades, en forma manual con masajeo glandular suave[9].

Durante el tiempo de observación, fueron realizadas 13 extracciones, con períodos de ayuno entre 0 y 90 días. Con estos datos fue realizada una evaluación estadística consistente en:

I — Estudio de la cantidad promedio de veneno obtenido, desvio standard del lote y clasificación del período de ayuno en dos intervalos de clase: XI de 0 a 45 días y X2 de 46 a 90 días.

2 — A los efectos de comprobar diferencias entre los intervalos del punto I, se realizó análisis de varianza según Ledesma[14] y Kohan y Carro[13].

3 — Evaluación de la diferencia entre las medias del punto I a partir de la prueba de significación entre dos medias por el método del error standard según Ledesma[14].

4 — Aplicación del estadístico de Correlación (R) con motivo de analizar el grado de interdependencia entre las variables días de ayuno/cantidad de veneno seco obtenido, según Bancroft[1]. Luego se evaluó la significación del valor de R calculando los límites del intervalo de confianza de R, según Ledesma[14]

RESULTADOS

Los valores hallados para cada muestra están representados en la tabla I.

I — En el análisis de varianza obtuvimos para F $\propto$ (0,05) un valor FI,2 de 22,8. Por ser este valor encontrado para la diferencia entre XI y X2 con respecto a la cantidad de veneno seco obtenido mayor que el valor de tabla de F (3,84) para

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

n = 225, la diferencia entre XI y X2 es entonces estadisticamente significativa. Cabe destacar que la muestra X2 arrojó un valor promedio de veneno seco, un 42% mayor que la muestra XI.

2 — En el análisis de los datos de las muestras, realizamos la prueba de significación de la diferencia entre dos medias. La suma de los errores standard de cada muestra (6,6 y 12,5 respectivamente para XI y X2) es menor a la diferencia entre las medias (35,73), por lo tanto la diferencia es significativa.

3 — Para obtener el grado de interdependencia entre las variables días de ayuno/cantidad de veneno seco obtenido en mg, se empleó el índice de Correlación (R), hallándose un valor positivo de 0,4. Luego se calcularon los límites del intervalo de confiança de R para la probabilidad de 0,05. Los valores encontrados fueron 0,27 y 0,53 por lo que nuestro valor de R es de significación estadística.

DISCUSION

La producción de veneno para la elaboración de sueros específicos está supeditada al mantenimiento de un lote de ofidios en forma permanente. Es obvio que, en un serpentario donde la tasa de ingreso anual de ejemplares es baja, debe procurarse ampliar la supervivencia de los mismos. Uno de los factores que aumentan la mortalidad en cautiverio, es el stress causado por el manejo en la extracción de veneno, por lo tanto resulta importante minimizar el contacto con los animales. Por otro lado, de este modo, disminuyen los riesgos del operador.

La comprobación que el ayuno previo a la extracción influye en forma significativa sobre la producción de veneno, permite una planificación precisa ya ensayada para otros ofidios[11]. Dicha planificación consiste en un cronograma en el cual los ejemplares son sometidos a tres meses de ayuno previo a la extracción seguidos de tres meses de alimentación normal luego de la extracción[10]. Este sistema permite dos extracciones por año. Como ha sido indicado por otros autores[6,17,24] períodos mayores de 90 días de ayuno podrían poner en peligro la vida del animal, por eso, si bien la cantidad de veneno obtenido aumenta, como ha sido observado en *Crotalus durissus terrificus*[11], no fueron tomados períodos que sobrepasen ese lapso.

Esto lleva a que, si se van a espaciar las extracciones, las mismas deben proporcionar cantidades de veneno que justifiquen la implementación de este cronograma. El promedio de 118 mg por víbora obtenido para *Bothrops alternatus* (X2) sometidas a extracciones semestrales, sumado a la baja mortalidad del lote (50% de los ejemplares ingresados cada año contra aproximadamente 80% para XI), nos permite afirmar que el sistema justifica su implementación. Es interessante comparar lo expresado anteriormente con lo referido por Belluomini[2,3] para una colonia de *B. alternatus* sometida a extracciones quincenales y bajo estimulación eléctrica, con un rendimiento de 74 mg de veneno seco por víbora y una mortalidad del 86,7% para el primer año. Por otro lado, es importante destacar que nuestro valor de supervivencia es mayor al referido por Cowan[7] quién consigna un porcentaje de mortalidad del 80% para los ejemplares durante los dos primeros años de cautiverio, cuando en nuestro caso tal porcentaje sólo alcanza el 65% para el mismo período de tiempo[19]. Asi, mientras que para el 80% de los individuos sometidos a ayunos de 0 — 45 días, sólo fueron realizadas de 1 a 1,5 extracciones promedio antes de su muerte, en ejemplares con ayunos de 46 — 90 días hemos logrado un promedio de 10 a 12 extracciones, llegando algunos individuos a lograr períodos de permanencia útil en cautividad de hasta 13 años.

SciELO

Con respecto a la composición, Sobol et al.[22] informan que sucesivas extracciones podrían disminuir la producción de proteinas y su actividad enzimática en el veneno. Asi mismo, la regeneración de los componentes farmacológicos tras sucesivas extracciones, no es simultanea y algunas fracciones pueden tardar hasta 45 días después de las mismas[21]. Por lo tanto, el espaciado en los períodos entre extracciones facilita la presencia de todos los componentes químicos normalmente presentes.

Los resultados obtenidos son recomentados para ser volcados en un laboratorio productor si se quieren tomar iniciativas para maximizar la cantidad de antígeno colectado por extracción.

CONCLUSIONES

Intervalos de ayuno previos a la extracción de 46 a 90 días, arrojaron un valor de 118,03 mg de veneno seco promedio por ejemplar, valor un 42% mayor que para intervalos de 0 a 45 días (82,3 mg). Esta diferencia es de significación estadística.

La interdependencia de las variables días de ayuno/mg de veneno seco obtenido, fue analizada a través del índice de Correlación dando un valor positivo de 0,4, lo cual indica una correlación real significativa.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. N.O. Stanchi y al Lic. G. Schinella la lectura crítica del manuscrito asi como sus valiosos comentarios.

ABSTRACT: the present work was carried out in order to investigate the influence of starvation period on venom production in snakes *(Bothrops alternatus)* under captivity conditions. Samples was divided in two groups of starvation, 0 - 45 days and 46 - 90 days. Different statistical methods shows that venom production of group 46 - 90 days was 42% higher than 0 - 45 days ($P \propto 0.05$).

KEYWORDS: Bothrops alternatus, starvation, venom production.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANCROFT, M. *Introducción a la bioestadística*. EUDEBA, 1965. 246p.
2. BELLUOMINI, H.E. Venom production of snakes in captivity. *Mem. Inst. Butantan*, v. 32, p. 79-88, 1965.
3. EXTRACTION and quantities of venom obteined from some Brazilian snakes. *Col. Trab. Inst. Butantan*, v. 12, 1968/69.
4. BIASI, P. De, BELLUOMINI, H.E., FERNANDES, W. Ouantidades de veneno obtidas na extração de serpentes *Bothrops pradoi* (Hoge, 1948) (Serpentes-Viperidae--Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan*, v. 40/41, p. 155-166, 1976/77.
5. BIASI P. De, BELLUOMINI, H.E., HOGE, R.A., PUORTO, G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. *Mem. Inst. Butantan*, v. 40/41, p. 167-172, 1976/77.
6. COLLETTE, B.E. & CURRY, O.H. Mycotic keratitis in reticulated Phyton. *J. Amer. vet. med. Ass.*, v. 173, n. 9, p. 1117-1118, 1978.
7. COWAN, D. Diseases of captive reptiles. *J. Amer. vet. med. Ass.*, v. 153, n. 7, p. 848-859, 1968.

SciELO

8. DEORAS, P.J. Probable significance of venom yield record studies. *Mem. Inst. Butantan*, v. 33, n. 3, p. 767-774, 1966.
9. DI TADA, I.E. & DOUCET, M.E. *Informe técnico sobre mantenimiento de serpientes y producción de venenos.* Trab. apres. no 2do. Congreso Latinoamericano de Toxicología, Santa Fe, Argentina, 1973.
10. GRISOLIA, C.S., PELUSO, F.O., STANCHI, N.O. Informe sobre la actividad del Laboratorio y Museo de Animales Venenosos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. *Rev. argent. Prod. Anim.*, v. 6, n. 7/8, p. 517-519, 1986.
11. GRISOLIA, C.S., STANCHI, N.O., PELUSO, F.O. Relación entre el período de ayuno y cantidad de veneno extraido de ofidios en cautiverio. *Rev. argent. Prod. Anim.*, v. 6, n. 7/8, p. 513-516, 1986.
12. KOCHVA, E. A quantitative study of venom secretion by *Vipera palaetinae*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 9, p. 381-390, 1960.
13. KOHAN, N.C. & CARRO, J.M. *Estadística aplicada*. 5. ed. EUDE8A, 1972. 368p.
14. LEDESMA, D.A. *Estadística médica*. 2. ed. EUDEBA, 1980. 602p.
15. LEINZ, F.F., JANEIRO-CINOUINI, T., ISHIZUKA, M.M. Carbon dioxide as an auxiliary in the venom extraction of *Bothrops jararaca* snakes (Viperidae-Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan*, v. 52, n. 1, p. 17-23, 1990.
16. LELOUP, P. Essais de rationalisation dans le mantien d'un serpentarium a but industriel. *Acta trop.* v. 30, n. 4, p. 281-311, 1973.
17. VARIOUS aspects of venomous snake breeding on large scale. *Acta zool. pathol. Antverp.*, v. 78, p. 177-198, 1984.
18. OPS/OMS. *Manual de procedimientos, producción y pruebas de control en la preparación de suero Diftérico, tetánico, Botulínico, Antivenenoso y de la gangrena gaseosa*. 1977.
19. PELUSO, F.O., FRANCINI, F., GRISOLIA, C.S., STANCHI, N.O. Análisis de la supervivencia de *Bothrops alternatus* (Ophidia: Viperidae: Crotalinae) en cautiverio. *ACOVEZ*, v. 13, n. 4, p. 27-29, 1989.
20. ROLIM-ROSA, R., 8ELLUOMINI, H.E., SILES-VILLAROEL, M., IIZUKA, H. Efeitos sobre a toxicidade da mistura de venenos e a sobrevida de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, submetidos às extrações manual e elétrica. *Mem. Inst. Butantan*, v. 44/45, p. 245-251, 1980/81.
21. SCHEN8ERG, S., PEREIRA LIMA, F.A., NOGUEIRA-SCHIRIPA, L.N., NAGAMORI, A. Unparalleled regeneration of snake venom components in sucessive milkings. *Toxicon*, v. 8, n. 2, p. 156, 1970. (abstract)
22. SOBOL-8ROWN, R., 8DOLAH, A., KOCHVA, E., 8ROWN, M.8. Secretion of enzymes in the venom glands of *Vipera palaestinae* (Viperidae-Ophidia). *Toxicon*, v. 8, n. 2, p. 156, 1970 (abstract)
23. VIEIRA, E.G.J., ROLIM-ROSA, R., IIZUKA, H., FURTADO, M.F.D., FERNANDES, W. Influências sazonal e do processo de extração sobre a produção, toxicidade de veneno e sobrevida de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824). *Mem. Inst. Butantan*, v. 50, n. 1, p. 29-35, 1988.
24. WALLACH, J.D. Environmental and nutritional diseases of captive reptiles. *J. Amer. vet. med. Ass.*, v. 159, n. 11, p. 1631-1633, 1971.

SciELO

FRANCINI, F., PELUSO, F. O., GRISOLIA, C.S. Influencia del ayuno sobre la pruducción de veneno en **Bothrops alternatus** (Ophidia: Viperidae: Crotalinae). **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 205-210, 1991

TABLA I

BOTHROPS ALTERNATUS. Cantidad de veneno seco producido en valor promedio para cada intervalo de clase

Período Ayuno (en días)	Núm. datos	Promedio Ven. Seco (mg)	Desvío Standard	Error Standard
XI: 0-45	124	82,3	37	6,6
X2: 46-90	101	118,03	63	12,5
total	225	95,4	55,6	

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 53, n. 2, p. 213-228, 1991

COLETÂNEA DE RESUMOS DE TRABALHOS PUBLICADOS PELOS PESQUISADORES DO INSTITUTO BUTANTAN (1990)

SciELO

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1990). **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 213-228, 1991

1. ALMEIDA, M.S. de, FURTADO, M. de F. D., SANT'ANNA, O.A., VIEIRA, E.G.J., HENRIQUES, S.B.
A computation program to analyse data obtained in quantal assays
Cie. Cult, v. 42, n. 7, p. 445-452, 1990

Abstract: A computation program is described which allows the probit analysis of data obtained from assays of drugs which produce an all-or-none effect when administered to experimental animals. The program was applied: a) to determine the potency of standard preparations of bothropic and crotalic venoms which were sent to the Ministry of Health to constitute standards for assaying anti-venom antisera in Brazil; b) to verify whether drying the bothropic venom spontaneously at room temperature leads to a decrease in its lethal potency; c) to determine the lethal potency of the venom of *Bothroos erythromelas*; and d) to compare the sensitivity to bothropic venom of two genetically selected mouse strains.

Resumo: É feita a descrição de um programa de computação que permite a análise probítica de dados obtidos na determinação da potência de drogas que produzam efeitos do tipo tudo-ou-nada, quando administradas a animais experimentais. O programa foi aplicado: a) para determinar as potências das preparações de veneno botrópico e crotálico, as quais foram enviadas ao Ministério da Saúde como padrões para determinação de potências de soros anti-peçonhentos neste país; b) para verificar se o dessecamento espontâneo de veneno botrópico a temperatura ambiente produz um decréscimo de sua potência letal; c) para determinar a potência letal do veneno de *Bothrops erythromelas*; e d) para comparar a sensibilidade ao veneno botrópico de duas linhagens de camundongos geneticamente selecionadas.

2. ASSAKURA, M.T. & MANDELBAUM, F.R.
Cleavage of immunoglobulins by *Moojeni* protease A, from the venom of *Bothrops moojeni*
Toxicon, v. 28, p. 734-736, 1990

Abstract: Moojeni protease A, a proteolytic enzyme isolated from the venom of *Bothrops moojeni* hydrolyzes human and rabbit IgGs. The resulted fragments retained the combining though not the precipitating power or the property to fix complement. Similar to papain, *moojeni* protease A releases directly Fab fragments from IgG. In contrast to papain, however, the enzyme does not require the presence of thiol compounds either for activation or for reduction of the IgG disulphide inter-heavy chain bridges. On the contrary, *moojeni* protease A is a metalloenzyme inhibited in the presence of thiol compounds.

Resumo: Moojeni protease A, uma enzima proteolítica isolada do veneno de *Bothrops moojeni*, hidrolisa IgG humana e de coelho. Os fragmentos resultantes mantêm a capacidade de combinar mas não de precipitar antígenos ou de fixar complemento. *Moojeni* protease A, semelhante à papaína, libera fragmentos Fab diretamente do IgG. Entretanto, diferentemente da papaína, a enzima não requer a presença de compostos tióis para sua ativação, bem como para redução das ligações dissulfeto intra-cadeias pesadas do IgG. *Moojeni* protease A, é ao contrário, uma metaloenzima inibida na presença de compostos tióis.

3. ASSAKURA, M.T. & MANDELBAUM, F.R.
Limited proteolysis of human and rabbit immunoglobulins by snake venoms produces FAB-Like fragments
Brazilian J. Med. Bio. Res., v. 23, p. 1.233-1.235, 1990

Abstract: Rabhit and, to a lesser extent, human immunoglobulins (IgGs) are cleaved by snake venoms. The snake venom proteases active on IgGs release fragments which behave on SDS-PAGE like Fab units similar to those released by the thiol-activated enzymes. However, in contrast to the cysteine proteases, the activity of snake venom proteases on IgGs is not only blocked by metal chelating agents but is also inhibited by thiol compounds. The snake enzymes active on IgG are metalloproteases.

Resumo: Imunoglobulinas (IgGs) de coelho e, em menor extensão, imunoglobulinas humanas, são hidrolisadas por venenos de serpentes. As proteases de venenos de serpentes ativas sobre IgGs liberam fragmentos pue, por eletroforese em SDS-gel de poliacrilamida, se comportam como unidades Fab, similares àquelas liberadas por enzimas ativadas por compostos tiol. Entretanto, diferentemente das cisteíno-proteases, a atividade das proteases de venenos de serpentes sobre IgGs é bloqueada por agentes metalocomplexantes e também inibida por compostos tióis. As enzimas de venenos, ativas sobre IgGs, são metaloproteases.

4. BARRETTO, O.C. de O., DE CILLO, D.M., NONOYAMA, K., ANTONIO, L.C., MORENA, P., CARDOSO, J.L.C.
Methemoglobinemia associated with loxoscelism
Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 32, n. 1, p. 1-5, 1990

Abstract: In twenty five patients who presented the cutaneous form of loxoscelism, serum haptoglobin and lactic dehydrogenase, erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, methemoglobin, bilirubin and reticulocytes were investigated after bite. No hemolysis was detected but an increase in methemoglobin was found in 54% of the cases; in 7% it was between 1.1% and 2%, in 27% it ranged from 2.1% to 4%, and in 20% from 4.1% to 8%. Blood samples of a normal, blood group O individual and of a patient who exhibited methemoglobinemia after Loxosceles bite were incubated separately with antisera against *Loxosceles gaucho, Crotalus terrificus, Bothrops jararaca*, with *Loxosceles gaucho* venom and 0.3% phenol. No methemoglobin was found after 1, 4, 8 and 15 days in both sets of samples. At the 25th day all the samples, including the controls, exhibited similar methemoglobin reductase decrease. The data suggest that the methemoglobinemia which occurs in 50% of the patients probably arises from *in vivo* venom metabolism, inasmuch as the crude venom does not induce methemoglobinemia.

SciELO

Resumo: Meta-hemoglobinemia associada ao loxoscelismo. Vinte e cinco pacientes que apresentaram a forma cutânea do loxoscelismo foram estudados após a picada, determinando-se a glicose-6-fosfato desidrogenase, glutationa redutase e glutationa peroxidase critocitárias, haptoglobina e latico desidrogenase séricas, bilirrubina, reticulócitos e metahemoglobina. Não foi observada hemólise aumentada, mas foi detectado aumento da meta-hemoglobina em 54% dos casos: em 7% entre 1,1% e 2%, em 27% variou de 2,1% a 4%, e em 20% de 4,1 a 8%. Amostras de sangue de um indivíduo normal do grupo 0 de uma paciente que exibiu meta-hemoglobina após picada por *Loxosceles* foram incubadas separadamente com anti-soros contra *Loxosceles gaucho, Crotalus terrificus* e *Bothrops jararaca*, com veneno de *Loxosceles gaucho* e fenol a 3%, e não se detectou aumento de meta-hemoglobina depois de 1, 4, 8 e 15 dias em todas as amostras. Por ocasião do 25º dia, todas as amostras, inclusive os controles, exibiram discreta diminuição da atividaoe da meta-hemoglobina redutase. Os dados sugerem que a meta-hemoglobina que ocorreu em 54% dos pacientes provavelmente decorreu do metabolismo do veneno, uma vez que o veneno *in natura* não induziu meta-hemoglobinemia

5. BRENO, M.C., YAMANOUYE, N., PREZOTO, B.C., LAZARI, M.F.M., TOFFOLETTO, O., PICARELLI, Z.P.
Maintenance of the snake *Bothrops jararaca* (WIED, 1824) in captivity.
The SNAKE, v. 22, p. 126-130, 1990

Abstract: Male and female specimens of *Bothrops jararaca*, collected from nature and classified by the Seção de Herpetologia, Instituto Butantan, were maintained in a room under controlled environmental conditions (27°C / 65,3 ± 0.9% relative humidity/12h light — 12h dark).
Study of the development, in captivity, of newborn *Bothrops jararaca* born, between 1986 and 1988, from pregnant female coming from nature were also performed.
The numoer of surviving nakes maintained under those conditions has increased and, their development was greater between the first and the second year of life. The values of weight and length obtained from three years old snakes were similar to those of adult specimens collected in nature.
The data presented contribute to improve snake breeding care and also, to establish the best conditions to maintain this reptile in captivity. The knowledge of the development of such snakes in captivity allow to infere the age of those snakes used as laboratory animals.

Resumo: Serpentes *Bothrops jararaca*, de ambos os sexos, vindas da natureza e classificadas pela Seção de Herpetologia do Instituto Butantan, foram mantidas em biotério com condições ambientais controladas (27°C / 65,3 ± 0,9% de umidade relativa / 12h claro — 12h escuro).
Paralelamente, conduziram-se estudos sobre o desenvolvimento, em cativeiro, dos filhotes nascidos entre 1986 e 1988, das serpentes prenhes recebidas da natureza.
A partir de 1986, o número de serpentes sobreviventes no primeiro ano de vida aumentou. Um maior crescimento, tanto em peso como em comprimento, foi observado do primeiro ao segundo ano de vida. Aos 3 anos de idade essas serpentes apresentaram peso e comprimento próximos aos valores dos espécimes adultos recebidos da natureza.
Os dados obtidos contribuem para a melhoria da criação de serpentes em cativeiro, como também para o estabelecimento de condições adequadas à vida desses répteis fora de seu "habitat". As informações sobre o desenvolvimento dos filhotes de *Bothrops jararaca* permitem inferir sobre a idade aproximada daquelas serpentes, vindas da natureza e utilizadas como animais de laboratório.

6. DOMINGOS, M.O., CARDOSO, J.L., MOURA DA SILVA, A.M., MOTA, I.
The humoral immune responses of patients bitten by the snake *Bothrops jararaca* (jararaca)
TOXICON, v. 28, n. 6, p. 723-726, 1990

Abstract: The isotype and specificity of antibodies produced by patients bitten *B. jararaca* and submitted to serum therapy were studied. The IgG anti-*B. jararaca* antibodies have large individual dispersion, starting to appear 10 days after the first bite and increasing to at least 80 days after the bite. IgM antibodies appeared sooner than IgG antibodies but disappeared about 20 days after the bite. Secondary responses induced by an additional bite were characterized by a fast and higher IgG antibody response with no apparent change in the IgM antibody. The immunoblotting test showed that the specificity of human anti-*B. jararaca* antibodies is heterogeneous, each patient recognizing different fractions in the *B. jararaca* venom.

Resumo: Estudou-se o isótipo e especificidade dos anticorpos produzidos por pacientes picados por *B. jararaca* e submetidos a soroterapia. Os anticorpos IgG anti-*B. jararaca* mostraram uma grande dispersão individual, começando a aparecer 10 dias após a primeira picada e aumentando até 80 dias após. Os anticorpos IgM apareceram mais cedo porém desapareceram cerca de 20 dias após a picada. A resposta secundária induzida por picada adicional caracterizou-se por uma produção mais rápida e maior dos anticorpos IgG, sem alteração dos anticorpos IgM. Os testes de immunoblotting mostraram que a especificidade dos anticorpos humanos anti-*B. jararaca* é heterogênea, cada paciente reconhecendo diferentes frações do veneno botrópico.

7. DURAN, N., MARCUCCI, M.C., GATTI, M.S.V., LEITE, L.C.C.
Different lethal effects by enzyme — generated triplet indole-3-aldehyde in different *Escherichia coli* STRAINS
J. Photobiochem. Photobiol, B: Biol, v. 4, p. 371-378, 1990

Abstract: Strains of Escherichia coli which lack 4-thiouridine (S^4U) exhibit a higher survival rate than their wild-type parents which contain S^4U after treatment with enzyme-generated triplet indole-3-aldehyde. In a similar manner to results obtained with monochromatic 334 nm UV light, the survival is related to single-strand breakage of DNA in E. coli containing the pBR 322 plasmid. The effects of the excited states generated by an enzymatic system suggest that S^4U is an important chromophore in the lethal effects observed. The results also suggest

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

that the energy transferred from triplet indole-3-aldehyde to S^4U may also be passed from S^4U of t-RNA to DNA, possibly throught a singlet oxygen intermediate generated by excited S^4U, resulting in a decrease in the survival rate of E. coli containing S^4U. These results emphasize the importance of excited states in biological systems.

Resumo: Cepas de *Escherichia coli* que não contêm 4-tiouridina (S^4U) exibem uma sobrevivência maior que as células parentais contendo S^4U, após tratamento com indol-3-aldeído gerado enzimaticamente. De uma forma semelhante, resultados obtidos com luz UV 334 monocromática, a sobrevivência está relacionada à indução de quebras de fita simples em DNA de plasmídeo p8R 322 contido em *E. coli*. O efeito de espécies excitadas geradas enzimaticamente sugere que S^4U é um cromóforo importante na letalidade observada. Os resultados também sugerem que a energia transferida de indol-3-aldeído tripleto para S^4U pode também ser transferido do t-RNA ao DNA, possivelmente através de um oxigênio singlete intermediário gerado por S^4U, resultando na diminuição da sobrevivência de *E. coli* contendo S^4U. Estes resultados enfatizam a importância de estados excitados em sistemas biológicos.

8. FETT-CONTE, A.C., TAJARA, E.H., VARELLA-GARCIA, M., SANTOS, R.E.S.
Constitutional y/15 translocation in a woman with lung cancer.
Rev. Bras. Genet., v. 13, n. 3, p. 629-633, 1990

Abstract: In the course of fragile site investigations on 16 patients with leukemia, lymphoma and lung cancer, a 74-year-old woman with lung cancer was found to have additional heterochromatica material on 15p. G.C. O and Ag-NOR banding suggested that an important part of the long arm of the Y chromosome was translocated to the short arm of chromosome 15.

Resumo: O presente trabalho descreve uma paciente portadora de câncer de pulmão que apresenta material heterocromático extra no braço curto do cromossomo 15. A análise em bandamento G.C. O e Ag-NOR sugere uma translocação envolvendo o braço longo do cromossomo Y e o braço curto do cromossomo 15.

9. HO, P.L., CARPENTER, M.R., SMILLIE, L.B., GAMBARINI, A.G.
Co-purification of proteases with basic fibroblast growth factor (FGF)
Biochem, Biophy, Res. Comm., v. 170, n. 2, p. 769-774, 1990

Abstract: Acidic and basic fibroblast growth factors (FGFs) are proteins of 16-18 kDa. Other forms of 25-30 kDa related to this growth factor family have recently been described. All these components bind tightly to heparin-Sepharose, a property that allows the purification of several FGF-related proteins. During the purification of acidic and basic FGFs from bovine pituitary glands, we detected the presence of 28-30 kDa components that are immunoreactive against anti-basic FGF antiscra. However, microsequencing analysis revealed that the 28-30 kDa components are lysosomal proteases that co-elute with basic FGF from heparin-Sepharose columns. The involvement of these proteases in the etiology of microheterogenous forms of FGFs and/or release of FGFs from the extracellular matrix is discussed.

Resumo: Fatores de Crescimento (FGFs) Ácido e Básico são proteínas de 16-18 kDa. Outras formas de 25-30 kDa relacionadas a esta família de fatores de crescimento têm sido recentemente descritos. Todos estes componentes ligam-se a Heparina-Sepharose, uma propriedade que permitiu o isolamento de várias proteínas FGF relacionadas. Durante a purificação de FGFs Ácido e Básico de hipófises bovinas, nós detectamos a presença de componentes de 28-30 kDa que eram imunorreactivos com antisoros anti-FGF Básico. Entretanto, estudos de microsseqüenciamento revelaram que os componentes de 28-30 kDa são proteases lisossomais que co-eluem com o FGF Básico da coluna de Heparina-Sepharose. É discutido o possível envolvimento dessas proteases na etiologia de formas micro-heterogêneas de FGFs e/ou na liberação de FGFs da matriz extracelular.

10. JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A.
Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil.
Rev. Ass. Med. Brasil., v. 36, n. 2, p. 66-77, 1990

Abstract: The present article reviews the current knowledge on incidence, epidemiology, pathophysiology, clinical features, diagnosis and prognosis of accidents by poisonous snakes of Brazil. *Bothrops, Crotalus, Lachesis* and *Micrurus* are the genera responsible for more than 100 deaths per year. With the exception of *Micrurus*, all cause clotting disturbance; *Lachesis* and *Bothrops* cause destruction of the tissue at the region of the bite, *Crotalus* and *Micrurus* cause failure at the neuromuscular junction and only *Crotalus* cause systemic myotoxicity. The clinical aspect is normally sufficient for diagnosis, except for the distinction between bothropic and lachetic accidents. Treatment with the specific heterologous serum must be started precociously by endovenous route. It is also important to maintain the patient hydrated and, in the case of *Micrurus* bites, adequate aereation must be applied

Resumo: O presente artigo revisa conhecimentos referentes à incidência, epidemiologia, fisiopatologia, quadro clínico, diagnóstico e prognóstico dos acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil que são responsáveis por mais de 20.000 acidentes e 100 óbitos por ano. Pertencem a quatro gêneros: *Bothrops, Crotalus, Lachesis* e *Micrurus*. Excetuando as *Micrurus*, todas causam distúrbios na coagulação sanguínea; as *Lachesis* e *Bothrops* provocam destruição tecidual na região da picada, as *Crotalus* e *Micrurus*, bloqueio na placa motora e somente as *Crotalus*, miotoxicidade sistêmica. O quadro clínico geralmente é suficiente para o diagnóstico, exceto na distinção entre acidente botrópico e laquético. O tratamento com soro heterólogo específico deve

SciELO

ser realizado precocemente, por via endovenosa. É também importante manter os pacientes hidratados e, no caso de picados por *Micrurus*, prestar assistência ventilatória adequada

11. JORGE, M.T., MENDONÇA, J.S. de, RIBEIRO, L.A., SILVA, M.L.R. da, KUSANO, E.J.V., CORDEIRO, C.L. dos S.
Flora bacteriana da cavidade oral, presas e venenos de *BOTHROPS JARARACA*: possível fonte de infecção no local da picada
Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 32, n. 1, p. 6-10, 1990

Abstract: Bacterial flora of the oral cavity, fangs and venom of *Bothrops jararaca*: possible source of infection at the local bite. Culture of fang, fang sheath and venom of fifteen healthy freshly captured *Bothrops jararaca* were analised. The bacteria most frequently encountered were group *D streptococci* (12 snakes), *Enterobacter* sp. (6), *Providencia rettgeri* (6), *Providencia* sp. (4), *Escherichia coli* (4), *Morganella morganii* (3) and *Clostridium* sp. (5). The bacteria observed are similar to those found in the abscesses from Bothrops bitten patients. Since these snake mouth bacteria may be inoculated during the snake bite, bacterial multiplication and infection may occur under favorable conditions.

Resumo: Materiais colhidos das presas, das bainhas das presas e do veneno de 15 *Bothrops jararaca* recém-capturadas, aparentemente saudáveis, foram submetidos a exame bacterioscópico e cultura aeróbia a anaeróbia. As bactérias mais freqüentemente isoladas foram os estreptococos do grupo D (12 serpentes), *Enterobacter* sp. (6), *Providencia rettgeri* (6), *Providencia so* (4), *Escherichia coli* (4), *Morganella morganii* (3) e *Clostridium* sp. (5). Como estas bactérias são semelhantes às encontradas nos abscessos de pacientes picados por serpentes do gênero Bothrops, é válido considerar a possibilidade de que bactérias da boca da serpente sejam inoculadas no momento da picada e, encontrando condições favoráveis de multiplicação, causem infecção.

12. JULIANO, L., CHAGAS, J.R., HIRATA, I.Y., CARMONA, E., SUCUPIRA, M., OLIVEIRA, E.S., OLIVEIRA, E.B., CAMARGO, A.C.M.
A Selective assay for endoligopeptidase a based on the cleavage of fluofogenic substract structurally related enkephalin
Biochem. Biophys. Res. Comm., v. 173, n. 2, p. 647-652, 1990

Abstract: A novel quenched fluorescence substrate, OF-ERP7 (Abz-G-G-F-L-R-R-V-EDDn), structurally related to enkephalins, proved to be suitable for assaying the endooligopeptidase A (E.C.3.4.22.19) activity. The enzyme only splits the L-R. Bond (Km 1.75 μ M, kcat 8.25 s^{-1}), a reaction efficiently blocked by anti-endooligopeptidase A antibodies and by inhibitor and alternative substrates of the enzyme. Evidences based on the action of inhibitors and on the analysis of OF-EFP7 fragments demonstrated that endooligopeptidase A contributes with 100% of the OF-ERP7 cleaving activity found in the cytosol of rabbit brain homogenates andwith 85% of that recovered in the membrane fraction. Homologous substrates. Abz-G-G-F-L-R-R-EDDn and Abz-G-G-F-L-R-EDDn, were resistant to hydrolysis. The convenience and sensitivity of the florimetric assay based on the OF-ERP7 molety offers several advantages compared with previously described painstaking procedures for endooligopeptides A activity measurements, what will certainly contribute to further our understanding of the role of this enzyme on the peptide hormone metabolism.

Resumo: Um novo substrato de fluorescência apagada, OF-ERP7 (Abz-G-G-F-L-R-R-V-EDDn), relacionado estruturalmente com as encefalinas, mostrou ser adequado para o ensaio da atividade enzimática da endo-oligopeptidase A (E.C.3.4.22.19). A enzima hidrolisa apenas a ligação L-R (Km = 1,75 μ M, kcat = 8,25 s^{-1}), uma reação eficientemente bloqueada por anticorpos antiendo-oligopeptidase A, por inibidores e por substratos alternativos da enzima. Evidências baseadas na ação de inibidores e na análise dos fragmentos de OF-ERP7 demonstraram que a endo-oligopeptidase A contribui com 100% para a atividade hidrolítica sobre OF-ERP7 encontrada no citosol de homogenados de cérebro de coelhos e com 85% para aquela detectada na fração de membranas. Substratos homólogos, Abz-G-G-F-L-R-R-EDDn e Abz-G-G-F-L-R-EDDn, foram resistentes à hidrólise. A sensibilidade e a conveniência de um ensaio fluorimétrico baseado na molécula de OF-ERP7 oferecem várias vantagens quando comparadas com procedimentos trabalhosos descritos previamente para a detecção da atividade enzimática da endo-oligopeptidase A, que irão certamente contribuir para nosso conhecimento mais profundo do papel dessa enzima no metabolismo dos hormônios peptídicos.

13. KAWANO, T., SIMÕES, L.C.G., CORRÊA, F.M.A.
Chromosomes of *Pomacea* sp. (Perry, 1811) (Mesogastropoda, Mollusca)
Rev. Bras. Genet., v. 13, n. 4, p. 675-685, 1990

Abstract. A search was made for differences in *Pomacea* sp. through karyotype analysis. The genus *Pomacea* was studied as a biological control of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. A standard chromosome analysis was performed with the air dried technique, tested in embryos at the young veliger stage. The meiotic preparations were obtained through the same technique with the male gonad.
According to our results the present species has a diploid chromosome number of 2n = 28, represented by 9 metacentric pairs, 4 submetacentric pairs and 1 subtelocentric pair. The short arm of the subtelocentric pair showed a positive reaction to silver stained preparations, vg.; the site of the secondary constriction (NOR).
The meiotic analysis confirmed the presence of n = 14 chromosomes.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

Resumo: O estudo cariotípico em *Pomacea* sp é importante em virtude das grandes dificuldades taxonômicas apresentadas por este gênero e também por ser utilizado em experiências como controlador biológico da *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. A técnica utilizada para a obtenção de metáfases foi a de suspensão celular, elaborada em nosso laboratório. O cariótipo foi obtido em preparações realizadas com embriões, no estágio de veliger jovem. Esta espécie possui o número diplóide de 2n = 28 cromossomos constituído de 9 pares metacêntricos, 4 pares submetacêntricos e 1 par subtelocêntrico. O braço curto do par subtelocêntrico se mostrou positivo ao $AgNO_3$, local da constrição secundária (RON). A análise meiótica confirmou a presença de n = 14 cromossomos.

14. LEOPOLDO - e - SILVA, R., CORRÊA, F.M.A., CURI, P.R.
Influência da precocidade do primeiro repasto no desenvolvimento pós-embrionário de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) e de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) em condições de laboratório
Rev. Bras. Ent., v. 34, n. 2, p. 361-367, 1990

Abstract: Influence of precocity in the first meal on post-embrionary development of *Triatoma infestans* Klug 1834 and *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, in laboratory conditions. It has been studied the influence of the time of first feeding in relation to an early appearing of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*. First instar nymphs of both species of triatomine were fed only once on the 4^{th}, 8^{th} and 12^{th} day after eclosion. The first thirty nymphs were separated when moved to the second instar and observed till they have reached the adult stage. The feedings that follow were made weekly on pigeons during sixty minutes. For *T.infestans* it was verified that the smallest number of adults appeared in the group fed on the eight day, while for *R. prolixus* no significant difference among the three groups was observed.

Resumo: Objetivou-se verificar a influência da ocasião da primeira alimentação no desenvolvimento pós-embrionário de *T. infestans* e de *Rhodnius prolixus* em relação à precocidade do aparecimento dos adultos. Ninfas de 1º estádio de ambas as espécies de Triatomíneos foram alimentadas exclusivamente no 4º, no 8º ou no 12º dia após a eclosão. As primeiras trinta ninfas a mudarem para o 2º estádio foram separadas e observadas até alcançarem o estádio adulto. Os repastos seguintes foram realizados semanalmente em pombos durante sessenta minutos. Para *T. infestans* verificou-se que o menor número de adultos apareceu no grupo alimentado no oitavo dia ao passo que para *R. prolixus* não foi observada qualquer diferença entre os três grupos.

15. LEOPOLDO - e - SILVA, R., CORRÊA, F.M.A., PADOVANI, C.R.
Influência do comportamento gregário no desenvolvimento de *Triatoma infestans* Klug, 1834 e de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)
Rev. Bras. Ent., v. 34, n. 2, p. 297-301, 1990

Abstract: The influence of gregarious behaviour in survival and development of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* was studied. Fifty 1^{st} instar nymphs of both species were kept individually in test tubes and other fifty were grouped in beaker. Food was supplied for the first time, four days after eclosion, and then supplied weekly, till all adults have emerged. The number of dead insects for *R. prolixus* in the tubes and beaker was respectivelly 16 and 21; and for *T. infestans*, respectivelly 6 and 11. No significant differences were found in the development of both species, either isolated or grouped.

Resumo: A influência do comportamento gregário na sobrevida e desenvolvimento de *Rhodnius prolixus* e de *Triatoma infestans* foi estudada. Cinqüenta ninfas de 1º estádio da cada espécie foram mantidas individualmente em tubos de ensaio e outras tantas foram mantidas agrupadas em béquer. Repasto alimentar foi oferecido pela primeira vez, quatro dias após a eclosão e a partir daí, semanalmente, até o aparecimento dos adultos. O número de *R. prolixus* mortos nos tubos e no béquer foi respectivamente 16 e 21; e para *T. infestans*, respectivamente, 6 e 11. Não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento dos exemplares isolados ou agrupados de ambas as espécies.

16. LEOPOLDO - e - SILVA, R., CORRÊA, F.M.A., CURI, P.R.
Requerimento alimentar de adultos virgens e acasalados de *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) em condições de Laboratório
Bras. Ent 34, n. 2, p. 349-359, 1990

Abstract: The total amount of ingested blood, the frequency of repast of adults of both sexes when mated or not and their possible influences on the survival of *Triatoma infestans*, were studied. One group of 32 virgin males and other of 32 virgin females were fed weekly on pigeons during 30 minutes and weighted individually before and after the repast. Another group of 32 couples kept one couple per bottle was also analyzed the same way. The mean total amount of ingested blood, frequency of repast and survivals obtained for virgin mated males were, respectively: 1,884.82/2,062.59mg; 0.71/0.81 and 299.50/307.87 days; and for virgin/mated females were: 2,570.13/2,727.31mg; 0.88/0.92 and 205.25/166.03 days respectively.

Resumo: A quantidade total de sangue ingerido, a freqüência de repastos de adultos de ambos os sexos virgens ou acasalados e as possíveis influências sobre a sobrevida de *Triatoma infestans* foram observadas. Um grupo de 32 machos virgens e outro de 32 fêmeas virgens foram alimentados semanalmente em pombos durante 30 minutos e pesados individualmente antes e depois dos repastos. Outro grupo de 32 casais mantidos aos pares separadamente foi também analisado da mesma forma. A quantidade média total de sangue ingerido, a freqüência de repastos e as sobrevidas obtidas para machos virgens e acasalados foram respectivamente:

SciELO

1,884.82/2,062.59mg; 0.71/0.81 e 299.50/307.87 dias; e para fêmeas nas mesmas condições foram, respectivamente: 2,570.13/2,727.31mg; 0.88/0.92 e 205.25/166.03 dias.

17. LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M., FURTADO, M.F., OTERO, R., ROSSO, J. - P., VARGAS, O., CARMONA, E., ROVIRA, M.E.
Isolation of basec myotoxins form *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms
Toxicon, v. 28, n. 10, p. 1137-1146, 1990.

Abstract: Three myotoxins, one from the venom of *Bothrops atrox* and two from the venom, of *B. moojeni*, were isolated by ion-exchange chromatography on CM-Sephadex C-25. The three toxins are basic proteins with an estimated mol. wt of about 13,500, and similar amino acid compositions. When injected into the gastroenemius muscle of mice, the three toxins induce drastic myonecrosis of rapid onset, as juged by histological observation and quantitation of plasma creatine kinase levels. *B. atrox* myotoxin also has phospholipase A_2 and anticoagulant activities, whereas *B. moojeni* myotoxins I and II lack these effects. The three toxins are antigenically similar to each other, and to previously isolated myotoxins I and II from the venom of *B. asper*, when tested by gel immunodiffusion against rabbit antiserum to *B. asper* myotoxin I. Two monoclonal antibodies against *B. asper* myotoxins were tested against the newly purified proteins. MAb-3 recognizes all of them, whereas MAb-4 recognizes only *B. atrox* myotoxin, by enzyme-immunoassay. *B. atrox* and *B. moojeni* myotoxins can be tentatively classified within a group of myotoxins having phospholipase A_2 struture present in *Bothrops* venoms.

Resumo: Três miotoxinas, uma do veneno de *B. atrox* e duas do veneno de *Bothrops moojeni*, foram isoladas por cromatografia de troca iônica em CM-Sephadex C-25. As três toxinas são proteínas básicas com peso molecular estimado em torno de 13.500 e composição de aminoácido similar. Quando injetados no músculo gastrocnêmico de camundongos, as três toxinas induzem rapidamente drástica mionecrose, que é avaliada por observações histológicas e quantificação dos níveis plasmáticos de creatina quinase. A miotoxina de *B. atrox* também tem fosfolipase A_2 e atividade anticoagulante enquanto nas miotoxinas I e II de *B. moojeni* faltam estes efeitos. Quando testadas por imunodifusão em gel contra antisoro de coelho da miotoxina I de *B. asper*, as três toxinas são antigenicamente similares entre si e com as miotoxinas I e II previamente isoladas do veneno de *B. asper*. Dois anticorpos monoclonais contra miotoxinas de *B. asper* foram testados contra as proteínas purificadas. MAb-3 reconhece todas, enquanto MAb-4 reconhece somente a miotoxina de *B. atrox*, por enzima imunoensaio. As miotoxinas de *B. atrox* e *B. moojeni* podem ser classificadas dentro de um grupo de miotoxinas que tem estrutura de fosfolipase A_2 presente nos venenos de *Bothrops*.

18. LOMONTE, B., FURTADO, M.F., ROVIRA, M.E., CARMONA, E., ROJAS, G., AYMERICH, R., GUTIÉRREZ, J.M.
South american snake venom proteins antigenically related to *Bothrops asper* myotoxins
Brazilian J. Med. Biol. Res, v. 23, p. 427-435, 1990.

Abstract: The presence of proteins antigenically related to *Bothrops asper* myotoxins in various snake venoms, mainly from South America, was in investigated by using polyclonal and monoclonal antibodies.
2. Myotoxin-like components were detected in ten *Bothrops* venoms from South America, and in the venoms of *Crotalus atrox* (North America), *Trimeresurus flavoviridis* (Japan), and *Micrurus alleni* (Costa Rica).
3. Cross-reactive components detected in several *Bothrops* venoms show a commom subunit of 15-16 kDA by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel eletrocphoresis, although significant charge variations are evident by immunoelectrophoresis.
4. It is concluded that proteins antigenically related to *B. asper* myotoxins are relatively common in the genus *Bothrops* and, in the light of findings discussed, are likely to possess myotoxic activity.

Resumo: 1 — Foi investigada a presença de proteínas antigenicamente relacionadas com as miotoxinas de *Bothrops asper* em vários venenos de serpentes, principalmente da América do Sul, utilizando-se anticorpos policlonais e monoclonais.
2 — Os componentes tipo miotoxinas foram detectados em dez venenos de *Bothrops* da América do Sul, e nos venenos de *Crotalus atrox* (América do Norte), *Trimeresurus flavoviridis* (Japão), e *Micrurus alleni* (Costa Rica).
3 — Os componentes com reação detectados em vários venenos de *Bothrops* mostram uma subunidade comum de 15-16 KDa por eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida.
4 — É concluído que as proteínas antigenicamente relacionadas com as miotoxinas de *B. asper* são relativamente comuns no gênero *Bothrops* e possivelmente possuem atividade miotóxica

19. MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A.S., CARDOSO, J.L.C., SANO - MARTINS, I.S., CHUDZINSKI, A.M., SANTORO, M.L., MORENA,P., TOMY, S.C., ANTONIO, L.C., MIHARA, H., KELEN, E.M.A.
Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca)
Thromb. Haem. v. 63, n.3, p. 449-453, 1990

Abstract The blood coagulation and the fibrinolytic systems of nine patients envenomed by *Bothrops jararaca* in São Paulo (Brazil) were studied. Five of the accidents were caused by young snakes (< 50 cm). On admission, four patients had non-clotting and three partially-clotting blood. Fibrinogen levels were decreased due to the thrombin-like activity of the venom as expected. Consequent secondary activation of the fibrinolytic system was evident from the low levels of alpha-2-antiplasmin and the high titres of fibrin(ogen) degradation products. High titres of cross-linked fibrin fragment D (D-dimer) in seven patients together with decreased platelet counts and/or factor V, and/or factor VIII in some, suggests intrinsic thrombin formation as these factors are not consu-

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

med in the defibrinogenation induced by venom thrombin-like fractions such as Ancrod and Batroxobin. However, normal or increased levels of antithrombin III in all and normal levels of factor II in eight patients do not support this interpretation. The existence of variable concentrations of other proteins in the venom of *B. jararaca* such as botrocetin and thrombocytin isolated from *B. jararaca* and *B. atrox* or crotalocytin from *Crotalus horridus* venom should be considered. Such proteins are known to activate factors V, VIII, XIII, and platelets without affecting prothrombin (factor II) and antithrombin III. Slower recovery of the haemostatic diturbances after antivenom administration to patients bitten by young snakes suggests a more severe coagulopathy in such accidents. This is supported by clinical observations.

Resumo: Foram estudados os sistemas de coagulação sanguínea e de fibrinólise de nove pacientes com envenenamento por picada de *Bothrops jararaca* em São Paulo. Cinco desses acidentes foram causados por serpentes filhotes (< 50 cm). Na admissão, o sangue de quatro pacientes estava incoagulável e de três com coagulação parcial. Os níveis reduzidos de fibrinogênio eram esperados em vista da presença de atividade tipo trombina no veneno. A resultante ativação secundária do sistema fibrinolítico era evidente através dos níveis reduzidos de alfa 2-antiplasmina e dos elevados títulos de produtos de degradação de fibrin (ogênio). Formação de trombina intrínseca é sugerida pelos altos títulos de fragmentos D da fibrina estabilizada (D-dímero) em sete pacientes, junto a número diminuído de plaquetas e/ou de fator V, e/ou de fator VIII em alguns, uma vez que estes fatores não são consumidos na desfibrinogenação induzida pelas frações de veneno com atividade tipo-trombina, como o Ancrode e a Batroxobina. Entretanto, foram encontrados níveis normais ou elevados de antitrombina III em todos os pacientes, e níveis normais de fator II em oito deles, o que não apóia a última interpretação. Deve ser considerada a existência de concentrações variáveis de outras proteínas no veneno de *B. jararaca* tais como botrocetina e trombocitina isoladas de veneno de *B. jararaca* e de *B. atrox* ou crotalocitina do veneno de *Crotalus horridus*. Sabe-se que estas proteínas ativam fatores V, VIII, XIII e plaquetas sem afetar os níveis de protrombina (fator II) e antitrombina III. Após a administração do antiveneno, o distúrbio hemostático em pacientes acidentados por serpentes jovens apresentou recuperação mais lenta, sugerindo uma coagulopatia mais grave. Esta interpretação é apoiada pela observação clínica.

20. MEIRELLES, M.N.L., JULIANO, L., CARMONA, E., COSTA, E.M., SILVA, S.G, LIMA, A.T.V.C., ARNHOLDT, A.V., LEME, V.M.C., GUIMARÃES, E.S.P., BERRO, O.J., SCHARFSTEIN, J.
Functional and antigenic properties of the major cysteine proteinase (GP57/51) of *Trypanosoma cruzi*
Mem. Inst. Osw. Cruz (Rio de Janeiro), v.85, n.4, p.533-538, 1990

Abstract: In the first part of the present article, we will review information concerning the structure, function and biology of the cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi* (GP57/51). The perspectives of designing new trypanocidal drugs exploring the proteinase's sensitivity to thiol protease specific inhibitors will be briefly discussed, and the potential of this approach will be illustrated by *in vitro* infection assays carried out in the presence of perptidyl diazomethane inhibitors. In the last part of this article, we will critically discuss the performance of diagnostic kits prepared with purified GP57/51 (WHO-TDR sponsored Multicentre Study). The stability properties of the kit were investigated; we found that there was a significant decrease in the sensitivity of GP57/51 ELISA kits stored for more than 3 months at room temperature. Testes perfomed with freshly-coated plates confirmed that the antigen was perfectly capable of detecting CH samples (6 out of 29) missed at the time of the WHO-TDR study. A simple method to reactive the decaying kit was developed, indicating that reversible molecular interactions may take placein Ag-containing plastic wells. Distribution to blood center should be initiated as soon as best storage conditions are defined.

Resumo: Na primeira parte do presente trabalho, nós faremos uma revisão sobre a estrutura, a função e a biologia da cisteíno-proteinase do *Trypanosoma cruzi* (GP57/51). As perspectivas com relação a novas drogas tripanocidas, explorando a sensibilidade da proteinase a inibidores específicos de tiol proteases, serão discutidas sumariamente, e o potencial desta possibilidade será ilustrado por ensaios de infecção "in vitro" desenvolvidos na presença de inibidores peptidil-diazometanas. Na última parte deste artigo, nós vamos discutir de maneira crítica o desempenho dos "kits" para diagnósticos preparados com GP57/51 purificada (Estudo Multidisciplinar patrocinado por WHO-TDR). A estabilidade do "kit" foi investigada, verificamos que a sensibilidade dos "kits" GP57/51 ELISA diminuiu significativamente, quando estes foram armazenados por mais de 3 meses à temperatura ambiente. Testes executados com placas recentes confirmaram que o antígeno foi perfeitamente capaz de detectar amostras CH (exceto 6 entre 29) encontradas durante o estudo WHO-TDR. Um método simples para reativar o "kit" inativo foi desenvolvido, indicando que interações moleculares reversíveis devem ocorrer nos cavos de plástico contendo o antígeno. A distribuição para os bancos de sangue será iniciada assim que melhores condições de armazenamento sejam definidas.

21. MORO-FURLANI, A.M., CABELLO, P.H., KRIEGER, H.
Is there a sex-phenotype association for esterase D (EC 3.1.1.1)?
Hum. Hered., v. 40, p.118-120, 1990

Abstract: Recently, a significant sex distortion of the esterase D locus segregation, both in Portugal and Germany, was reported. In contrast to these puzzling results, data on around 1.200 informative northeastern Brazilian individuals did not show any signs of s sex-phenotype associaton ($\chi^2 = 0.35$). The joint analysis of this sample together with that of the previous report showed that, although the pooled material presented a significant sex distortion ($p < 0.05$), the heterogeneity was also high ($p < 0.05$) as to discourage any generalization based upon the European findings. Moreover, since the present samples is almost 3 times larger than the pooled European one, the whole picture suggests strongly that there is no segregation distortion attributed to sex, at this locus.

SciELO

Resumo: Recentemente foi relatado um desvio relacionado ao sexo para a segregação do locus da esterase D, em Portugal e na Alemanha. Contrastando com esses resultados, dados referentes a quase 1.200 famílias provenientes de uma população brasileira nordestina não mostraram sinal algum de uma associação sexo-fenótipo ($\chi^2 = 0.35$). Uma análise conjunta desta amostra com a relatada acima mostrou que, embora a amostragem conjunta apresente um desvio sexual significante ($o<0.05$), a heterogeneidade também é alta ($p<0.05$), desencorajando qualquer generalização baseada nos resultados europeus. Além do mais, sendo a presente amostra quase 3 vezes maior que as outras duas juntas, delineia-se um quadro com fortes sugestões de que não há, para o locus da ESD, desvio de segregação relacionado ao sexo.

22. MOURA DA SILVA, A.M., D'IMPÉRIO LIMA, M.R., NISHIKAWA, A.K., BRODSKYN, C.I., SANTOS, M.C. dos, FURTADO, M.F.D., DIAS DA SILVA, W.D., MOTA, I.
Antigenic cross-reactivity of venoms obtained form snakes of genus *BOTHROPS*
Toxicon, v. 28, n. 2, p. 181-188, 1990

Abstract: Antigenic cross-reactivity was studied among the components of fenoms from nine species of the genus *Bothrops* using species-specific antivenoms. Sera titration by DOT-ELISA detected similar levels of antibody when either homologous or heterologous antigens were used. Transblotted antigens, after SDS-PAGE fractionation, were also revealed by homologous and heterologous antivenoms. Antigens with mol. wt greater than 30,000 seemed to be the most cross-reactive. Antigens of about 24,000 mol. wt were poorly immunogenic. Antigens between 14-18,000 mol. wt cross-reacted only with *B. moojeni, B. jararacussu, B. neuwiedi* and *B.pradoi* venoms. Neutralization of the lethality of *B. jararaca* venom was observed by homologous and heterologous antivenoms.

Resumo: Reatividade antigênica cruzada foi estudada entre os componentes dos venenos de nove espécies do gênero *Bothrops* utilizando-se antivenenos espécies-específicos. Titulação do soro por DOT-ELISA detectou níveis similares de anticorpos quando são usados tanto antígenos homólogos como heterólogos. Antígenos transferidos para papel de nitrocelulose, após fracionamento por SDS-PAGE, também são revelados tanto por antivenenos homólogos como heterólogos. Antígenos com peso molecular maior que 30.000 parecem ter maior reatividade cruzada. Antígenos com peso molecular em torno de 24.000 são pouco imunogênicos. Antígenos de peso molecular entre 14-18.000 apresentam reação cruzada somente com os venenos de *Bothrops moojeni, B. jararacussu, B. neuwiedi* e *B. pradoi*. Foi observada a neutralização da letalidade do veneno de *B. jararaca* pelos antivenenos homólogos e heterólogos.

23. NEUMANN, B.G., TRONCONE, L.R.P., BRAZ, S., TUFIK, S.
Modifications on dopaminergic and cholinergic sustems induced by the water tank technique: analysis through yawning behavior
Pharmac. Therap., v. 308, n.1/2, p. 32-38, 1990

Abstract: Animals deprived of REM sleep by the water tank technique show an important decrease in frequency of yawning, induced by dopaminergic (apomorphine in low doses) and cholinergic (physostigmine and pilocarpine) agonists, if they are tested immediately after the 96 hr of deprivation. In order to understand the mechanisms underlying the effects of REM sleep deprivation on dopaminergic and cholinergic systems, we decided to test the animals after a recovery period of 24 hr. It was observed that apomorphine-induced yawning was stil significantly reduced, whereas pilocarpine-induced yawning had returned to normal. The findings suggest that REM sleep deprivation alters dopaminergic and cholinergic systems in different ways: it seems that the interference on the dopaminergic system is prior and stronger than on the cholinergic system, thus its recovery demands more time.

Resumo: Animais privados de sono REM pelo método do tanque de água apresentam uma redução importante da freqüência de bocejos induzidos por agonistas dopaminérgicos (apomorfina em baixas doses) e colinérgicos (fisostigmina e pilocarpina), quando administrados imediatamente após as 96 hs. de privação. Para melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à privação de sono REM nos sistemas dopaminérgico e colinérgico, decidimos testar os animais após um período de recuperação de 24 hs. Observou-se que os bocejos induzidos por apomorfina estavam ainda significativamente reduzidos enquanto que os bocejos induzidos por pilocarpina haviam retornado aos níveis normais. Os resultados sugerem que a privação do sono REM altera de forma diferente os sistemas dopaminérgico e colinérgico: aparentemente a alteração do sistema dopaminérgico é primária e mais intensa que a do sistema colinérgico, acarretando uma maior demora na sua recuperação.

24 OSHIRO, T.T., TEIXEIRA, C.F.P., OGA, S.
Propylene glycol enhances anti-inflammatory effects of phenylbutazone
Gen. Pharmac., v. 21, n. 1, p. 131-134, 1990

Abstract: 1. The interference of propylene glycol with anti-inflammatory effects of phenylbutazone was investigated.
2. Inhibitory effect of phenylbutazone on both carrageenin-induced edema and the cotton pellet granuloma was increased when propylene glycol was used as solvent.
3. Propylene glycol given alone inhibited carrageenin-induced edema and pleurisy, as well as granulomatous tissue formation.
4. Some pharmacokinetic parameters of phenylbutazone were also changed by propylene glycol administered simultaneously.
5. These results suggest that propylene glycol probably increases the anti-inflammatory effect of phenylbutazone by summation and by raising the plasma half-life and the distribution volume of phenylbutazone.

SciELO

Resumo: Estudou-se a interferência do propilenoglicol no efeito antiinflamatório da fenilbutazona. O uso do propilenoglicol como solvente da fenilbutazona resultou em aumento do efeito inibitório da droga sobre o edema induzido pela carragenina e no granuloma causado pelo implante de bolas de algodão em ratos. Além disso o propilenoglicol por si só inibiu ambas as reações inflamatórias. Por outro lado a combinação da fenilbutazona com o propilenoglicol resultou em alteração dos parâmetros farmacocinéticos da fenilbutazona. Esses resultados sugerem que o propilenoglicol potencia o efeito antiinflamatório da fenilbutazona por somação de efeitos, e por aumentar a meia vida plasmática bem como o volume de distribuição desse fármaco.

25. PALERMO-NETO, J. & DORCE, V.A.C.
Influences of estrogen and/or progestirone on some dopamine related behavior in rats
Gen. Pharmac., v. 21, n. 1, p. 83-87, 1990

Abstract: 1. The effects of ovariectomy and/or of female hormonal treatments on open-field behavior, apomorphine-induced stereotypies and haloperidol-induced catalepsy were studied in rats.
2. Rat's locomotion frequency was significantly decreased by 17β-estradiol and estradiol plus progesterone treatments; this open-field parameter was not affected by progesterone administration per se.
3. 17β-estradiol and progesterone treatments, alone or in combination decreased apomorphine-stereotyped behavior.
4. Haloperidol effects were higher in both 17β-estradiol plus progesterone treated rats.
5. Progesterone treatment alone, decreased the duration of catalepsy induced by the minor (1.0 mg/kg) neuroleptic dose.
6. These results were discussed in the ligth of a possible interference of estrogen and/or progesterone on dopaminergic transmission at the level of the nigroestratial pathway.

Resumo: Foram estudados os efeitos da ovariectomia e/ou tratamento hormonal na atividade geral no campo aberto, na estereotipia induzida pela apomorfina e na catalepsia induzida pelo haloperidol em ratas.
A freqüência de locomoção foi significantemente diminuída pelos tratamentos com estradiol e estradiol mais progesterona.
Os tratamentos com estrógeno e progesterona sozinhos ou combinados diminuíram o comportamento estereotipado induzido pela apomorfina.
O efeito do haloperidol foi mais intenso nos animais tratados tanto com estradiol quanto com estradiol mais progesterona.
O tratamento com progesterona diminuiu a duração de catalepsia induzida somente pela menor dose do neuroléptico.
Os resultados foram discutidos como sendo uma possível interferência do estrógeno e da progesterona na transmissão dopaminérgica ao nível da via nigroestriatal.

26. PIETRO PEREIRA, A.S., SAKAUCHI, M.A., PEREIRA, A., CREPALDI, R.F., SHIMIZU, Y., MALUCELLI, M.I.C., MUTTI PEREIRA, M.M.
Rendimento, tempo de destoxificação e eficiência do processo de produção da vacina pertussis com os meios de cultura de Cohen & Wheeler e Stainer & Scholte
Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, v. 26, n. 1, p. 1-15, 1990

Abstract: Suspensions of *Bordetella pertussis* cultivated for 24 hours in Biolafitte 50L fermentors in STAINER & SCHOLTE (SS) and COHEN & WHEELER (CW) culture media were inactivated with 0.1% formalin at 25°C for 48 hours, and at 25°C for 24 hours, or by heating at 56°C for 30 minutes and were concentrated by centrifugation. The utilization of the CW medium for *B. pertussis* cultivation followed by inactivation with 0.1% formalin was mostly adequate for a good yield, lower production cost and lesser time for detoxification. The CW medium rendered an economy of 41.28% in relation to the SS medium, when production costs were considered. The potency of both vaccines was superior to 4UI/dose and showed a significant correlation between the immunogenic activity and the Leukocytosis-Promoting Factor (LPF).

Resumo: Cultivos de 24 horas de *Bordetella pertussis* em fermentadores Biolafitte 50L, obtidos em meios de cultura de STAINER & SCHOLTE (SS) e COHEN & WHEELER (CW), foram inativados por formalina 0,1% a 35°C por 48 horas e a 25°C por 24 horas, ou pelo calor a 56°C por 30 minutos. As suspensões foram, então, concentradas por centrifugação. A utilização do meio de CW para o cultivo de *B. pertussis* seguido de inativação por formalina 0,1% demonstrou ser o método de produção da Vacina Pertussis mais adequado, tendo em vista o rendimento global, o custo de produção e o tempo necessário à destoxificação. O meio de CW apresentou uma economia da ordem de 41,28% em relação ao meio SS, quando avaliados os custos de produção. A potência das vacinas foi superior a 4UI/dose e demonstrou uma correlação significante entre atividade imunogênica e Fator Promotor da Leucocitose (LPF).

27. RIBEIRO, L.A. & JORGE, M.T.
Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *BOTHROPS JARARACA* adultas e filhotes
Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 32, n. 6, p. 436-442, 1990

Abstract: Four hundred and fifteen cases of bites by adult *Bothrops jararaca* (group A) were admitted to the Hospital Vital Brazil between 1981 and 1987. These cases were compared to 562 cases of bites by young snakes of the same species (group B) during the same period and at the same hospital. In group B blood incoagulability was more frequent when compared to group A. However in group A bites in the leg, use of tourniquet, tecidual damage (blister, necroses and abscess), were more frequent when compared to group B. The doses of sero given for the group A was greater when compared to group B.

SciELO

Resumo: Quatrocentos e quinze casos de acidentes por *Bothrops jararaca* adulta (grupo A) atendidos no Hospital Vital Brazil — Instituto Butantan, no período de 1981 a 1987 foram comparados com 562 casos de acidentes pela mesma serpente porém filhote, atendidos no mesmo local e período (grupo B). Os pacientes do grupo A apresentaram maior freqüência de picada na perna, de uso de torniquete, de destruição tecidual na região da picada (bolha, necrose e abscesso) e, em média, receberam maior dose de soro e permaneceram internados por período mais longo.
Quanto à sazonalidade, foram avaliados os acidentes por *Bothrops jararaca* atendidos no período de 1975 a 1988. Houve maior ocorrência no início e no final do ano, principalmente no início para picadas por serpentes adultas e no final para picadas por filhotes.

28. RIBEIRO, L.A., JORGE, M.T., PIESCO, R.V., NISHIOKA, S. de A.
Wolf spider bites in São Paulo, Brazil: a clinical and Epidemiological Study of 515 cases
Toxicon, v. 28, n. 6, 715-717, 1990

Abstract. Data obtained from 515 victims of bites of wolf spiders (family Lycosidae) who were attended in Vital Brazil Hospital, São Paulo City, Brazil, in a 5-year period (1979-1983) were analysed. Bites were more frequent in males (56%). All age groups were involved. Foot and hand were the preferential sites of bite (79%), and pain, generally mild, was the predominant symptom (83%). No local necrosis, a severe complication described in the previous literature, was detected, suggesting that those old cases were due to misdiagnosed Loxosceles spider bites. Specific antivenom was employed in only three cases which is evidence that physicians do not consider wolf spider bites to be severe.

Resumo: Foram analisados, retrospectivamente, 515 casos de acidentes por aranhas do gênero Lycosa atendidos no Hospital Vital Brazil - Instituto Butantan, no período de janeiro de 1979 a dezembro de 1983. Em todos os casos a aranha foi capturada no momento do acidente e identificada na Seção de Artrópodos Peçonhentos do Instituto Butantan. A maioria dos acidentes ocorreram entre as 06:00 e 18 horas (87%). Os pacientes do sexo masculino representaram 56% dos casos. A maioria dos atendimentos ocorreu dentro das três primeiras horas após a picada (60%). As regiões mais freqüentemente acometidas foram as mãos (40%) e os pés (39%). O sintoma mais comum foi a dor (83%) seguida de edema (19%) e eritema (14%). Não houve nenhum caso de formação de necrose e 13% dos pacientes não apresentaram sintomatologia. Com referência à terapêutica instituída no Hospital Vital Brazil, 73% dos pacientes não necessitaram de medicação, 7,6% receberam infiltração de anestésico local e o soro específico foi administrado em apenas um paciente. Os dados do presente estudo confirmam a benignidade do acidente por essa aranha.

29. RIZZO, E. de, BRAGANÇA PEREIRA, C.A. de, FANG, F.L.W., TAKATA, C.S., TENÓRIO, E.C.N., PRAL, M.M., MENDES, I.F., GALLINA, N.M.F.
Fotossensibilidade e termoestabilidade de vacinas contra o sarampo (CEPA Biken CAM 70) liofilizadas e/ou reconstituídas para administração
Rev. Saúde Públ. São Paulo, v. 24, n. 1, p. 51-59, 1990

Abstract: Three different lots of measles vaccines produced with the Biken CAM-70 virus strain were requested from the central cold store of the Public Health Department of the State of S. Paulo, Brazil, and assays on photosensitivity at 2-8° C, and on stability at 28, 36.5 and 45° C, were carried out to find out for how long these vaccines would maintain their minimum potency, established as being 3.70 $\log_{10}$ or 5000 $TCID_{50}$ (50% tissue culture infective dose) per human dose. The analysis of the adjusted straight regression lines indicated that, with the passage of time, the potency of lyophilized or reconstituted vaccines, as well as of vaccines exposed to or protected from light decreased. Ligth-exposed vaccines, however, became less potent than vaccines protected from the light. None of the vaccine lots studied, reconstituted and stored at 2-8° C, exhibited homogeneity as to sensitivity to light. When freeze-dried vaccines had their photosensitivity studied at 2-8° C, lots 1 and 2 presented greater thermal degradation when exposed to light that when protected from it. However, in both instances, it was found that potency fell bellow that taken as minimum for the Biken CAM-70 virus strain. At all other temperatures considered, even when protected from light, lots 1 and 2 did not retain the minimum potency. Lot 3 kept the expected stability for 60 days at 2-8° C when protected from light and for 40 days when unprotected, but is thermal degradation at other temperatures was more intense (28° C: 5 days; 36.5° C: 2 days; 45° C: 0.5 day). Taking into account the potency that measles vaccines produced with the Biken CAM-70 virus strain are required to contain in order to induce effective immunity, the three vaccine lots studied were found to possess low thermal stability and to lack homogeneity both in the freeze-dried as well as in the reconstituted form.

Resumo: Três lotes de vacinas contra o sarampo, produzidos com a cepa de vírus Biken CAM-70, sob as formas liofilizada e reconstituída, pertencentes ao estoque da rede de vacinação da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Brasil, foram submetidos a testes de sensibilidade à luz, à temperatura de 2 a 8°C, e de termoestabilidade (protegidos da luz) às temperaturas de 28, 36,5 e 45°C, objetivando verificar por quanto tempo retinham sua potência, isto é, a concentração ideal recomendada para a cepa de vírus presente (3,70 $\log_{10}$ $DICT_{50}$ ou 5.000 doses infectantes de cultura de tecidos 50% por dose). A análise de retas de regressão ajustadas demonstrou que, de modo geral, tanto os lotes de vacinas liofilizados como os reconstituídos, mantidos às referidas temperaturas, expostos ou protegidos da luz, apresentaram queda de potência no decorrer do experimento, a qual foi mais acentuada para vacinas expostas à luz. Reconstituídos e mantidos a 2 a 8°C, os lotes não apresentaram homogeneidade no referente à sensibilidade à luz. Quando a fotossensibilidade de lotes de vacinas liofilizadas foi testada a 2 a 8°C, eles mostraram-se mais sensíveis à degradação térmica quando expostos à luz do que quando protegidos dela. Entretanto, expostos ou protegidos, a potência foi inferior à mínima aceita

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

para a cepa Biken CAM-70. Às demais temperaturas, mesmo ao abrigo da luz, os dois lotes não retiveram potência mínima. Quanto às vacinas do lote 3, conservadas a 2 a 8°C, mantiveram-se de acordo com os requerimentos mínimos de potência durante 60 dias quando protegidas da luz, e durante 40 dias quando expostas a ela. A degradação térmica às demais temperaturas foi mais acentuada (28°C: 5 dias; 36,5°C: 2 dias; 45°C: 0,5 dia). Considerando a concentração viral mínima que vacinas produzidas com a cepa Biken CAM-70 devem conter para induzir efetiva resposta imunológica, os lotes de vacinas pesquisados (sob a forma liofilizada ou reconstituídas para administração) apresentaram, além de baixa estabilidade ao calor, pouca homogeneidade com relação a este parâmetro.

30. SILVA, A.C. da, MASSA, S., SANT'ANNA, O.A.
Preliminary results corroborating the polygenic control of immunological tolerance
Brazil. J. Med. Biol. Res., v. 23, p.581-584, 1990

Abstract: Tolerance-susceptible (TS) and — resistant (TR) lines of mice are in the process of bidirectional genetic selection starting from a genetically heterogeneous population achieved by the equilibrated intercrossing of eight inbred lines. Mice are intragastrically pretreated and then immunized with ben ovalbumin or bovine serum albumin and the extreme phenotypes are selected for assortative mating. The normal distribution of agglutinin titers in the F_0 population and the significant interline difference already observed in the F_2 and F_3 generations indicate that oral tolerance is a character controlled by the additive effect of several independent loci. The mean heritability (h_2 obtained thus far is 11% for the TS line and 19% for the TR line

Resumo: Linhagens de camundongos susceptíveis (TS) ou resistentes (TR) à tolerância estão sendo obtidas através de seleção bidirecional a partir de uma população geneticamente heterogênea resultante do cruzamento equilibrado de 8 linhagens isogênicas. Camundongos são pré-tratados por via gástrica e depois imunizados com ovoalbumina ou soroalbumina bovina e os fenótipos extremos estão sendo selecionados por acasalamentos direcionados. A distribuição normal dos títulos de aglutinina na população F_0 e a diferença interlinhagens significante já observada nas gerações F_2 e F_3 indicam que a tolerância oral é um caráter controlado pelo efeito aditivo de vários loci independentes. A herdabilidade média (h_2) calculada até agora é de 11% para a linhagem TS e 19% para a linhagem TR.

31. SOARES, M.F.M., PERINI, A., MOTA, I., MACEDO, M.S.
Further characterization of *ASCARIS SUUM* component (s) with suppressive activity on the IgE antibody response *Brazil.*
J. Med. Biol. Res., v. 23, p. 589-592, 1990

Abstract: In order to characterize the component(s) of *Ascaris suum* responsible for damping of the IgE antibody production we demonstrated that the extract incubated in sodium acetate buffer, pH 4.5, maintained its suppressive effect and the same protein banding pattern by SDS-PAGE. Elimination of the lipoprotein components of the extract also left its damping properties unchanged. SDS-PAGE of the lipoprotein-free extract revealed pratically the same pattern as shown by the whole extract, except for the high molecular weight polypeptides. These results indicate that the suppressive component(s) of *A. suum* did not precipitate and retained their activity at low pH. In addition, they appear not to be lipoproteins.

Resumo: A fim de caracterizar os componentes do *Ascaris suum* responsáveis pela redução na produção de anticorpos IgE, nós demonstramos que o extrato de *Ascaris suum* incubado em tampão acetato pH 4.5 manteve o mesmo poder supressivo e as mesmas bandas protéicas em SDS-PAGE. A eliminação dos componentes lipoprotéicos do extrato também não alterou suas propriedades supressoras. Análise por SDS-PAGE do extrato isento de lipoproteínas mostrou praticamente as mesmas bandas do extrato total, exceto pelos polipeptídios de alto peso molecular. Estes resultados indicam que os componentes supressivos do *A. suum* não precipitam e retêm a sua atividade em pH baixo. Além disso, eles não parecem ser lipoproteínas.

32. SOGORB, S.F., SANTANA, E.O. de, DAMY, S.B., RODRIGUES, U.P., CHAGURI, L.C.A.G.
Importância da proteína para o conhecimento: estudo experimental em coelhos *Oryctolagus cuniculus*
Salusvita, v. 9, n. 1, p. 71-80, 1990

Abstract: The proteic malnutrition was experimentally reproduced in young rabbits, related to ponderable gain and mortaly. The animals were observed during the lactation and after weaning. One group was fed with 16,2% of protein diet and it was considered as the normal proteic control. Another group was fed with a 9,7% diet, being considered the hypoproteic group. After weaning, some of the young related to each group remained with the same diet and some were transferred to another group. In order to compare the average of the final weight, the gain of weight and the mortality; the tukey and X^2 tests were applied. The results show that precocious hypoproteic feeding reduce the weight and increase the mortality rate which are significative when compared to the normal proteic control, keeping these parameters even when the normal feeding is reestablished.

Resumo: Experimentalmente reproduziu-se em láparos a desnutrição protéica, relacionando-a com ganho ponderal e mortalidade. Os animais foram observados durante as fases de aleitamento e após desmame. Um grupo recebeu ração contendo 16,2% de proteína e considerado como controle normoprotéico. Outro, recebeu ração contendo 9,7%, sendo grupo hipoprotéico. Após o desmame, parte dos láparos pertencentes a cada grupo permaneceu com a mesma ração e parte passou para a outra. O peso final, o ganho de peso e a taxa de mortalidade intra e entre grupos foram submetidos aos testes de Tukey e X^2, com nível de rejeição adotado de 5%. Os resultados demonstram que a alimentação hipoprotéica precoce causa redução de peso e maior taxa de

SciELO

mortalidade, significativas quando comparadas ao controle normoprotéico, permanecendo esses parâmetros mesmo quando restabelecida a alimentação normal.

33. STIFFEL, C., IBANEZ, O.M., RIBEIRO, O.G., DECREUSEFOND, C., MOUTON, D., SIQUEIRA, M., BIOZZI, G.
Genetic of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses
Experim. Clinic. Immunogenet., v.7, p. 221-233, 1990

Abstract: Acute inflammation is induced by the subcutaneous injection of swollen polyacrylamide microbeads, its intensity measured by the cell and protein concentration of the local exudates. A large and continuous range of responses is obtained in different inbred strains of mice, which suggests a polygenic control of the inflammatory response. The variable levels of the global dominance observed in F_1 hybrids issued from several parental combinations indicated that the pattern of alleles controlling high or low response was different in each parental strain. Balanced intercrossing of the 8 inbred strains studied has provided a genetically heterogeneous F_3 population, presenting a high variability of responses. The value of the genetic part of F_3 phenotypic variance, the spread of the interstrain differences, as well as the polygenic nature of the regulation of inflammatory responses pointed out the possibility to perform a bidirectional genetic selection by using the F_3 mice as the foundation population, and response to microbeads as the selective phenotypic character.

Resumo: Inflamação aguda foi induzida por injeção subcutânea de microesferas de poliacrilamida e a sua intensidade medida pela concentração celular e protéica do exsudato local. Variação grande e contínua das respostas foi obtida em diferentes linhagens isogênicas de camundongos, fato que sugere controle poligênico da resposta inflamatória. Os níveis variáveis de dominância global observada nos híbridos F_1 obtidos de diferentes combinações das linhagens parentais sugere que os padrões de alelos controladores da resposta alta ou baixa são diferentes em cada linhagem. Cruzamento balanceado das 8 linhagens isogênicas estudadas produziu uma população F_3 geneticamente heterogênea apresentando grande variabilidade de respostas. O valor da parte genética da variância fenotípica de F_3, a amplitude das diferenças entre as linhagens assim como a natureza poligênica da regulação da resposta inflamatória indicam a possibilidade de realização de seleção genética bidirecional usando os híbridos F_3 como população inicial e a resposta às microesferas de poliacrilamida como caráter fenotípico selecionados.

34. TAKEHARA, H.A., SILVA, A.M.M. da, BRODSKYN, C.I., MOTA, I.
A comparative study of anti-*TRYPANOSOMA CRUZI* serum obtained in acute and chronic phase of infection in mice
Immunol. Lett., *v. 23*, p. 81-86, 1989/1990

Abstract: The IgG antibody content, specificity, lytic activity, clearance capacity and protective ability of mouse anti-*Trypanosoma cruzi* serum was determined during the course of infection. The IgG antibody content increased during the course of infection, reaching its highest level in the serum collected in the chronic phase of the infection. The *T. cruzi* antigens recognized by antibodies using the protein transfer technique also increased with time of infection. Antibodies present in day 22 post-infection (p.i.) serum were already able to recognize all the antigens detected by antibodies present in serum from the chronic phase. The lytic and clearance ability were not detected on day 7 p.i., but appeared on day 14 p.i. and reached their highest level on day 45 p.i. The protective ability was present in serum of the chronic phase, but was absent from the acute serum. The IgG antibody content of the acute serum was four times less than that of the chronic serum. When the IgG antibody concentration of the acute serum was equalized to that of the chronic serum, the acute serum was as able to protect the infected animals as the chronic serum. It is suggested that the disagreement between the protective ability of anti-*T. cruzi* antisera collected in the acute or in the chronic phase of the infection is due to a quantitative rather than a qualitative difference.

Resumo: Determinou-se o teor em anticorpos IgG, a especificidade, a atividade lítica, a capacidade de induzir clearance e a capacidade protetora de soro de camundongo anti-*T. cruzi* durante o curso da infecção. Os anticorpos IgG aumentaram no curso da infecção, alcançando seu nível mais alto no soro coletado na fase crônica da infecção. O número de antígenos do *T. cruzi* reconhecidos pelos anticorpos também aumentou no curso da infecção. Os anticorpos presentes no 22º dia da infecção já reconheciam todos os antígenos detectados pelo soro crônico. A capacidade lítica e de clearance não estavam presentes no 7º dia após a infecção, apareciam no 14º dia e alcançavam seu pico no 45º. A capacidade de transferir proteção estava presente no soro crônico porém ausente do soro colhido na fase aguda. O conteúdo em anticorpos IgG do soro agudo era 4 vezes menor do que o do soro crônico. Quando a concentração de anticorpos IgG foi tornada igual àquela do soro crônico, o soro agudo tornou-se também capaz de proteção. Sugere-se que a discordância entre o poder protetor dos soros agudo e crônico é devida a uma diferença quantitativa.

35. TEIXEIRA, C.F.P., YASAKA, W.J., SILVA, L.F., OSHIRO, T.T., OGA, S.
Inhibitory effects of beryllium chloride on rat liver jicrosomal enzymes
Toxicology, *v. 61*, p. 293-301, 1990

Abstract: A single i.v. dose (0.1 mmol Be^{2+}/kg) of beryllium chloride prolonged the duration of pentobarbital-induced sleep and zoxazolamine-induced paralysis, in rats. The effects are correlated with changes of the pharmacokinetic parameters and with the *in vitro* inhibition of both aliphatic and aromatic hydroxylation of pentobarbital and pentobarbital and zoxazolamine. *In vitro* N-demethylation of meperidine and aminopyrine was partially inhibited while O-demethylation of quinidine was unaffected by liver microsomes of rats pretreated with beryllium salt. The findings give clues that beryllium chloride inhibits some forms of cytochrome P-450, especially those responsible for hydroxylation of substrates, like pentobarbital and zoxazolamine.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1990). **Mem. Inst. Butantan**, v. **53**, n. 2, p. 213-228, 1991

Resumo: A administração de cloreto de berílio a ratos, em dose única (0,1 mmol Be^{2+}/kg, i. v.), prolongou a duração do tempo de sono e de paralisia induzidos, respectivamente, pelo pentobarbital e zoxazolamina. Esse efeito correlacionou-se com alterações dos parâmetros farmacocinéticos e com a inibição *in vitro* da hidroxilação alifática e aromática do pentobarbital e zoxazolamina. Adicionalmente, o pré-tratamento dos ratos com cloreto de berílio causou inibição parcial da N-desmetilação da meperidina e aminopirina, enquanto a O-desmetilação da quinidina não foi afetada. Esses dados permitiram concluir que o cloreto de berílio inibe algumas formas do citocromo P-450, particularmente aquelas responsáveis pela hidroxilação de substratos como o pentobarbital e a zoxazolamina.

36. UMEKITA, L.F. & MOTA, I.
Role of platelets in the *In vivo* removal of *T. cruzi* from circulation
Brazil. J. Med. Biol. Res., v. 23, p. 593-596, 1990

Abstract. The possible role of platelets in the clearance of *Trypanosoma cruzi* was studied *in vivo* in A/sn female mice. Platelet depletion achieved by anti-platelet IgG antibodies induced a significant, though not total, reduction in the rate of removal of *T. cruzi* bloodstream trypomastigotes (BTRYS) from the circulation. Furthermore, during removal of *T. cruzi* BTRYS from the circulation of normal mice there was a simultaneous decrease in the number of platelets. These results suggest that platelets play a role in the *in vivo* mechanism of defense against *T. cruzi* infection.

Resumo: A possível função das plaquetas no clearance do *Trypanosoma cruzi* foi estudado *in vivo* em camundongos A/Sn. A plaquetopenia induzida por anticorpos IgG anti-plaquetas produziu uma redução significante embora parcial da velocidade de remoção dos tripomastigotas da circulação. Além disso, durante a remoção dos tripomastigotas ocorreu uma diminuição simultânea das plaquetas. Estes resultados sugerem que as plaquetas têm um papel no mecanismo de defesa contra o *T. cruzi*.

SciELO

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

ALMEIDA, M.S. de 213
ANTONIO, L.C. 213, 218
ARNHOLDT, A.V. 219
ASSAKURA, M.T. 213
AYMERICH, R. 218
BARRETTO, O.C. de O. 213
BERRO, O.J. 219
BIOZZI, G 224
BRAGANÇA PEREIRA, C.A. de 222
BRAZ, S. 220
BRENO, M.C. 214
BRODSKYN, C.I. 220, 224
CABELLO, P.H. 219
CAMARGO, A.C.M. 216
CARDOSO, J.L.C. 213, 214
CARMONA, E. 216, 218, 219
CARPENTER, M.R. 215
CHAGAS, J.R. 216
CHAGURI, L.C.A.G. 223
CHUDZINSKI, A.M. 218
CORDEIRO, C.L. dos S. 216
CORRÊA, F.M.A. 216, 217
COSTA, E.M. 219
CREPALDI, R.F. 221
CURI, P.R. 217
DAMY, S.B. 223
DE CILLO, D.M. 213
DECREUSEFOND, C. 224
DIAS DA SILVA, W. 220
D'IMPÉRIO LIMA, M.R. 220
DOMINGOS, M.O. 214
DORCE, V.A.C. 221
DURAN, N. 214
FANG, F.L.W. 222
FETT — CONTE, A.C. 215
FURTADO, M.F.D. 213, 218, 220
GALLINA, N.M.F. 222
GAMBARINI, A.G. 215
GATTI, M.S.V. 214
GUIMARÃES, E.S.P. 219
GUTIÉRREZ, J.M. 218
HENRIQUES, S.B. 213
HIRATA, I.Y. 216
HO, P.L. 215
IBANEZ, O.M. 224
JORGE, M.T. 215, 216, 221, 222
JULIANO, L. 216, 219
KAMIGUTI, A.S. 218
KAWANO, T. 216
KELEN, E.M.A. 218
KRIEGER, H. 219
KUSANO, E.J.V. 216
LAZARI, M.F.M. 214

SciELO

LEITE, L.C.C. 214
LEME, V.M.C. 219
LEOPOLDO-E-SILVA, R. 217
LIMA, A.T.V.C. 219
LOMONTE, B. 218
MACEDO, M.S. 223
MALUCELLI, M.I.C. 221
MANDELBAUM, F.R. 213
MARCUCCI, M.C. 214
MARUYAMA, M. 218
MASSA, S. 223
MEIRELLES, M.N.L. 219
MENDES, I.F. 222
MENDONÇA, J.S. de 216
MIHARA, H. 218
MORENA, P. 213, 218
MORO—FURLANI, A.M. 219
MOTA, I. 214, 220, 223, 224, 225
MOURA DA SILVA, A.M. 214, 220
MOUTON, D. 224
MUTTI PEREIRA, M.M. 221
NEUMANN, B.G. 220
NISHIKAWA, A.K. 220
NISHIOKA, S. de A. 222
NONOYAMA, K. 213
OGAS, S. 220, 224
OLIVEIRA, E.B. 216
OLIVEIRA, E.S. 216
OSHIRO, T.T. 220, 224
OTERO, R. 218
PADOVANI, C.R. 217
PALERMO-NETO, J. 221
PEREIRA, A. 221
PERINI, A. 223
PICARELLI, Z.P. 214
PIESCO, R.V. 222
PIETRO PEREIRA, A.S. 221
PRAL, M.M. 222
PREZOTO, B.C. 214
RIBEIRO, L.A. 215, 216, 221, 222
RIBEIRO, O.G. 224
RIZZO, E. de 222
RODRIGUES, U.P. 223
ROJAS, G. 218
ROSSO, J.P. 218
ROVIRA, M.E. 218
SAKAUCHI, M.A 221
SANO-MARTINS, I.S. 218
SANTANA, E.O. de 223
SANT'ANNA, O.A. 213, 223
SANTORO, M.L. 218
SANTOS, M.C. dos 220
SANTOS, R.E.S. 215
SCHARFSTEIN, J. 219
SHIMIZU, Y. 221

SciELO

SILVA, A.C. da ... 223
SILVA, A.M.M. da ... 224
SILVA, L.F. ... 224
SILVA, M.L.R. da ... 216
SILVA, S.G. ... 219
SIMÕES, L.C.G. ... 216
SIQUEIRA, M. ... 224
SMILLIE, L.B. ... 215
SOARES, M.F.M. ... 223
SOGORB S., F. ... 223
STIFFEL, C. ... 224
SUCUPIRA, M. ... 216
TAJARA, E.H. ... 215
TAKATA, C.S. ... 222
TAKEHARA, H.A. ... 224
TEIXEIRA, C.F.P. ... 220, 224
TENÓRIO, E.C.N. ... 222
TOFFOLETTO, O. ... 214
TOMY, S.C. ... 218
TRONCONE, L.R.P. ... 220
TUFIK, S. ... 220
UMEKITA, L.F. ... 225
VARELLA-GARCIA, M. ... 215
VARGAS, O. ... 218
VIEIRA, E.G.J. ... 213
YAMANOUYE, N. ... 214
YASAKA, W.J. ... 224

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA

VOLUME 2 — 1991 ISSN 0103-6548

Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan

COMISSÃO EDITORIAL

Rosalvo Guidolin
Wilmar Dias da Silva
Isaias Raw
Henrique Moisés Canter
Luiz Sebastião Prigenzi
Renata Lara Paes de Barros

SUMÁRIO

Padronização eletroforética de soros hiperimunes de cavalos.
Eletrophoretic standartize of horse hyperimmune sera.
M. A. STEPHANO; R. GUIDOLIN, W. DIAS DA SILVA; H. G. HIGASHI. 3

Preparação de soro albumina eqüina por fracionamento sulfato de amônio-etanol-calor
Equine sero albumin preparation by ammonium sulphate-ethanol-heat fractionation
J.R. MARCELINO; R. GUIDOLIN. 15

Produção de anatoxina estafilocócica purificada
Anatoxine staphylococcique purified production
J.A. FURUTA; E.P.T. de OLIVEIRA; S. de J.D. MATIAS; H.G. HIGASHI. 19

SciELO

Bol. Biotecnol.
v. 2, p. 3-13, 1991

PADRONIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DE SOROS HIPERIMUNES DE CAVALOS

Marco Antonio STEPHANO*
Rosalvo GUIDOLIN**
Wilmar DIAS da SILVA***
Hisako Gondo HIGASHI**

RESUMO: Os autores determinaram, através de análise eletroforética, as concentrações de diferentes proteínas séricas em cavalos produtores de plasma hiperimunes antitóxicos e antipeçonhentos. Os valores obtidos através da eletroforese em suporte de acetato de celulose (Cellogel[R]) sugerem a existência de 11 frações protéicas: Albumina, globulinas alfa 1a e 1b, alfa 2a, 2b e 2c, beta 1, 2a e 2b e gama 1 e 2. O objetivo destas observações foi o de traçar um perfil eletroforético de referência para ser utilizado como critério de avaliação da pureza dos soros heterólogos finais para o uso terapêutico humano.

UNITERMOS: Eletroforese, soro hiperimune, albumina, globulinas alfa, beta e gama.

INTRODUÇÃO

A eletroforese em suporte de acetato de celulose é aceita como um método eficiente para a separação de proteínas plasmáticas identificando as diversas frações separadas por suas cargas[2]. Todavia as raças, as alimentações e os habitats diferentes sob os quais os animais estão submetidos, acrescidos, ainda, da arbitrariedade do operador na separação das frações, de acordo com a sua experiência[9], os eletroforetogramas podem exibir diversidades de tal ordem que impossibilitam a obtenção de um perfil eletroforético de referência[4].

* Seção de Concentração e Fracionamento de Soros
** Serviço de IMUNOLOGIA
*** Laboratório Especial de IMUNOQUÍMICA
INSTITUTO BUTANTAN — CP 65 — São Paulo — SP
Recebido para publicação em 28.5.1990 e aceito em 14.2.1991

SciELO

O objetivo deste trabalho é o de demonstrar a possibilidade de obtenção de perfis eletroforéticos de referência, pela técnica proposta, segundo as condições de utilização e manutenção dos animais em cada estabelecimento produtor de soros hiperimunes de origem eqüina. A comparação dos resultados traçados antes e após as hiperimunizações oferecerá os requisitos necessários às avaliações, sejam da pureza dos soros, bem como da adequação da técnica empregada durante o processo de purificação dos respectivos plasmas.

A eletroforese em suporte de acetato de celulose, empregando os soros de cavalos antes do início das hiperimunizações, poderá servir como meio de seleção de animais bons produtores de anticorpos, refugando aqueles eventualmente portadores de agamaglobulinemia ou hipogamaglobulinemia[7].

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cavalos e amostragem:

Grupo A — animais soro-produtores, sem raça definida (SRD), pesando em média 400 kg, clinicamente sadios e submetidos a períodos de hiperimunização por mais de um ano e menos do que dois anos, assim discriminados:

Produtores de antivenenos:

Crotálico	9	amostras
Botrópico	9	"
Botrópico-Crotálico	9	"
Elapídico	9	"
Laquético	9	"
Aracnídico	9	"
Escorpiônico	6	"
Loxocélico	3	"

Produtores de antitóxicos:

Tetânico	9	amostras
Diftérico	9	"

Grupo B — animais semelhantes aos anteriores, não soro-produtores (Normais) — 9 amostras.

2. Sangrias e obtenção dos soros: Grupos A e B — o sangue foi obtido por punção da veia jugular, extraindo-se 20ml com seringas e agulhas esterilizadas. Os soros foram separados após a coagulação em câmara fria a 4°C.

3. Eletroforese

3.1 Aplicação da amostra: em cada fita de acetato de celulose (Cellogel^{R}), de 2,5×17,0 cm, foram aplicadas 3 amostras em volume de 5μl por amostra.

3.2. Corrida eletroforética: as fitas foram submetidas a tensão de 200 volts por 35 minutos, em tampão barbital sódico $^{+}$0,05M co 10mM de EDTA^{+}, a pH 8.6.

3.3. Coloração e descoloração: a coloração foi feita pelo corante de negro amido 10B+ solubilizado na mistura metanol: ác. acético glacial: H_2O, nas proporções de 45:10:45, respectivamente. A descoloração foi conseguida por lavagem das fitas em solução de metanol: ác. acético glacial: H_2O nas proporções de 47,5:5,0:47,5, respectivamente. Em seguida as fitas foram desidratadas em metanol puro e transparentizadas em solução de metanol: ác. acético glacial: glicerol, nas proporções de 85:14:1, respectivamente. A secagem, executada sobre placas de vidros em estufa a 37°C, foi obtida após 10 a 15 minutos.

3.4 Leitura: executada em densitômetro Zenite Z30 que revelou a existência de 11 frações no perfil. As frações receberam nomenclatura de acordo com a migração eletroforética desde a mais até a menos eletronegativa.

SciELO

3.5. Cálculos estatísticos: as mesmas frações protéicas observadas em soros de cavalos pertencentes ao mesmo serviço de hiperimunização tiveram suas médias e desvios padrões calculados, tanto em números percentuais, indicados pelo densitômetro como em número absoluto obtido pela determinação da concentração de proteínas totais do soro, pelo método de biureto[8], modulados a partir dos números percentuais.

RESULTADOS E CONCLUSÃO

De acordo com o especificado em material e métodos, as 11 frações reveladas nos perfis eletroforéticos foram denominadas: albumina (ALB), alfa 1a, 1b, 2a, 2b e 2c, beta 1, 2a e 2b e gama 1 e 2 globulinas (FIG. I).

Os resultados referentes ao soro normal de cavalos, concentrados na TAB.I, demonstram um desnivelamento dos valores, e, de certo modo, também na nomenclatura empregada por autores em trabalhos publicados anteriormente. Essas diferenças são devidas, principalmente, às raças, às alimentações e aos habitats não uniformes aos quais os animais estão submetidos. Ainda, neste particular, deve ser levada em conta a capacidade de resolução dos densitômetros utilizados nas leituras.

Das TABs. 2 e 3, que mostram as médias e os desvios padrões das frações em números percentuais, bem como os mesmos parâmetros da concentração total de proteínas, como também de cada fração em números absolutos e ainda o quociente ALB/globulina, respectivamente, deduz-se que: os dados sobre os soros antiofídicos e antiaracnídicos, expressos em gráficos, quando comparados com aqueles obtidos com o soro normal, apresentam a maioria das frações globulínicas aumentadas, entre as quais o aumento é mais significativo na fração gama 2, enquanto a fração albumina e alfa 1a estão diminuídas (FIGs. 2 e 3). Por outro lado, o quociente ALB/globulina aparece menor do que no soro normal, condições estas que demonstram uma resposta imunitária positiva ao estímulo antigênico[1]. No que se refere aos cavalos produtores de soros antitóxicos, os resultados comparados com o soro normal mostram que a maior parte das frações globulínicas estão elevadas, enquanto as concentrações das globulinas alfa 1a, gama 1 e gama 2 não estão significativamente diferentes. No entanto, nos soros dos cavalos produtores de antitoxina tetânica ou diftérica, observa-se um aumento acentuado da fração beta 2b, responsável pelo baixo quociente ALB/globulina. Weir e Porter[10]observaram este aumento das betas globulinas em cavalos imunizados com anatoxinas ou toxinas bacterianas, tal observação é em decorrência do aumento de uma subclasse de imunoglobulina denominada IgG(T). Pelas experiências, agora realizadas, verifica-se que é a fração beta 2b que se encontra aumentada (FIG. IV).

Frente aos resultados encontrados nestas experiências, parece ser lícito concluir que:

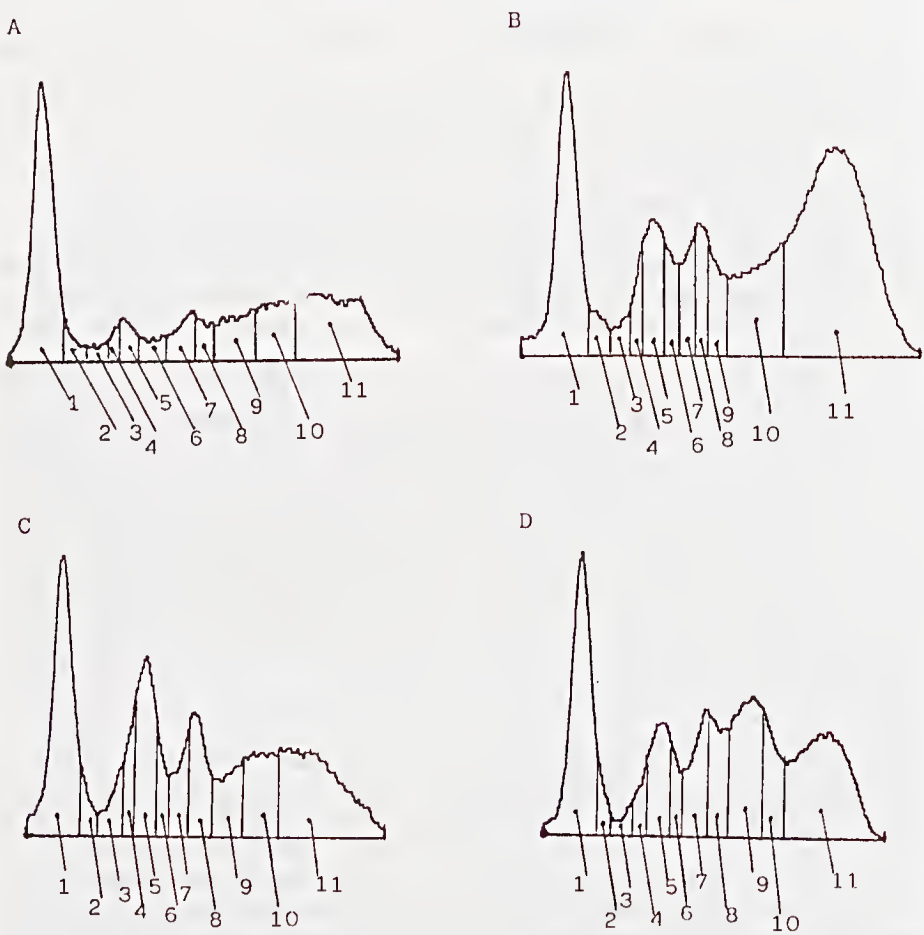
1 — a pureza e o rendimento satisfatórios do soro heterólogo final pronto para uso terapêutico estão diretamente relacionados às presenças das frações beta 2b, gama 1 e gama 2 globulinas.

2 — a técnica apresentada possibilita o diagnóstico de eventuais casos de agamaglobulinemia ou de hipogamaglobulinemia pois, nestas situações, observa-se ausência de IgM e IgA (ambas com motilidade igual a gama 1) e também de IgG(T) (motilidade igual a beta 2b) e de outras IgG (motilidade igual a gama 2) existente em baixas concentrações (ao redor de 16mg/100ml) e, obviamente, ausência de atividade dos anticorpos específicos para o antígeno empregado em animais imunizados. Devido a essa ausência de atividade dos anticorpos não há também a

SciELO

STEPHANO, M. A.; GUIDOLIN, R.; DIAS DA SILVA, W.; HIGASHI, H. G. Padronização eletroforética de soros hiperimunes de cavalos. **Bol. Biotecnol.**, v. 2, p. 3-13, 1991

PERFIL ELETROFORÉTICO DOS DIVERSOS SERVIÇOS DE PRODUÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES



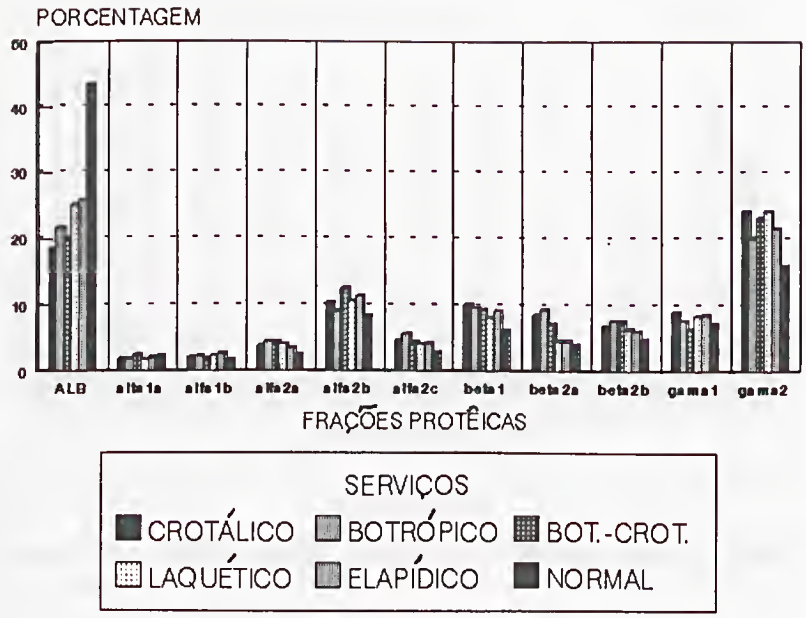
1 — ALBUMINA
2 — alfa 1a
3 — alfa 1b
4 — alfa 2a
5 — alfa 2b
6 — alfa 2c
7 — beta 1
8 — beta 2a
9 — beta 2b
10 — gama 1
11 — gama 2

A = SORO NORMAL
B = SORO ANTIOFÍDICO
C = SORO ANTIARACNÍDICO
D = SORO ANTITÓXICO

FIG. I

SciELO

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS SOROS ANTIOFÍDICOS EM NÚMEROS PERCENTUAIS



REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS SOROS ANTIOFÍDICOS EM NÚMEROS ABSOLUTOS

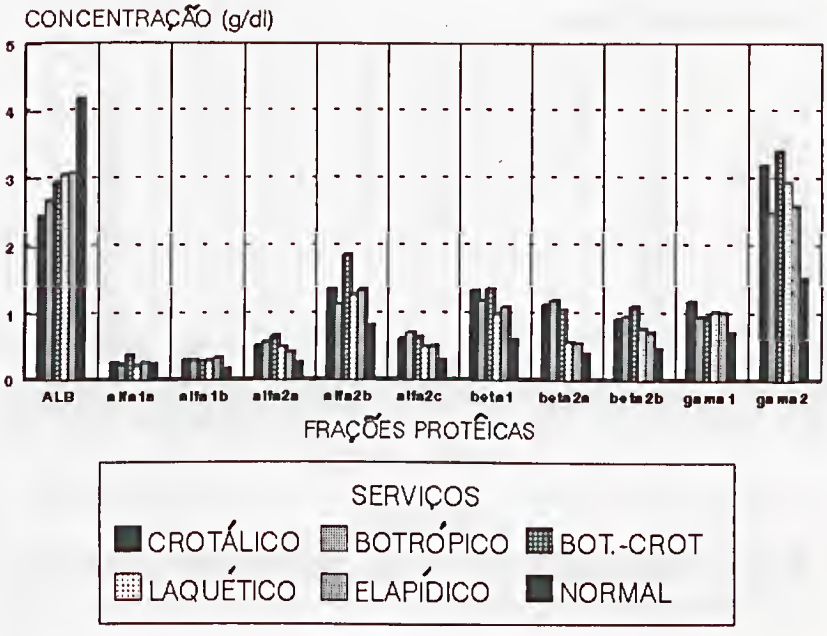
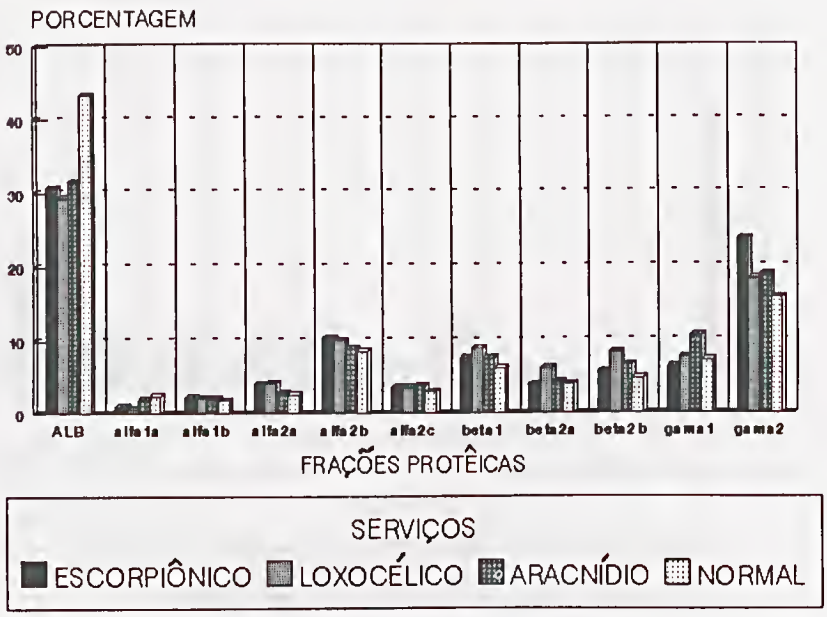


FIG. 2

SciELO

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS SOROS
ANTIARACNÍDICOS EM NÚMEROS PERCENTUAIS



REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS SOROS
ANTIARACNÍDICOS EM NÚMEROS ABSOLUTOS

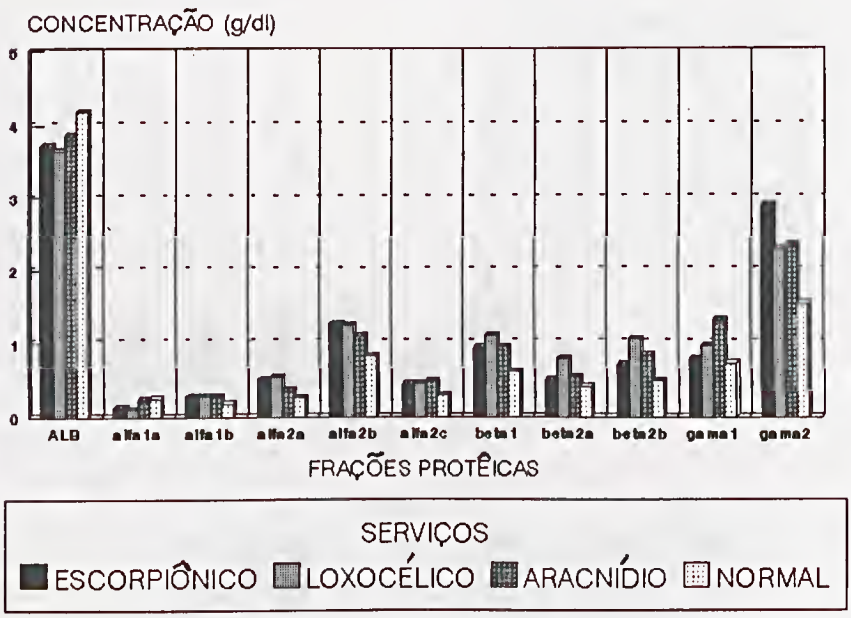
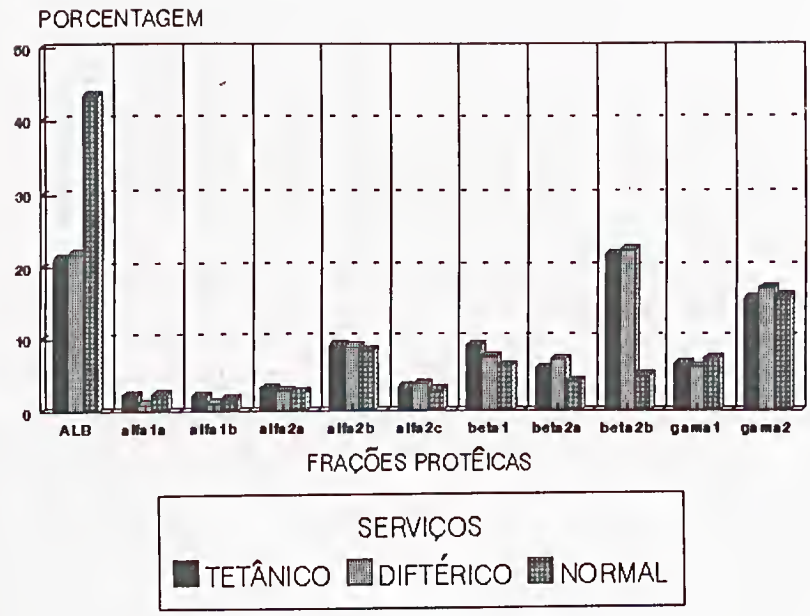


FIG. 3

SciELO

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS SOROS
ANTITÓXICOS EM NÚMEROS PERCENTUAIS



REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS SOROS
ANTITÓXICOS EM NÚMEROS ABSOLUTOS

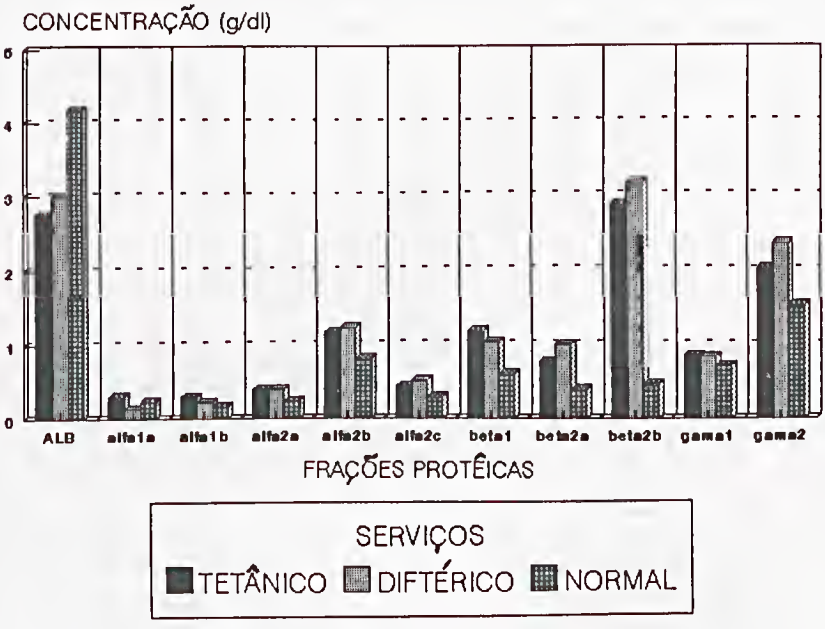


FIG. 4

SciELO

diminuição do quociente ALB/globulina, ficando este quociente igual ou maior do que aos animais considerados normais.

ABSTRACT: By eletrophoresis analysis, the authors determined the concentracion of blood proteins fractions in antitoxin and antipoisonous of horse hyperimmune sera. The value were getting by reading of the cellulose acetate strips (Cellogel^{R}) on densitometer, it suggest the existence of eleven proteins fractions: Albumin and globulins alpha (1a. 1b, 2a, 2b, and 2c), beta (1, 2a and 2b) and gamma (1 and 2). The main objective of this work was to gauge of eletrophoretic outline that it will be able used as reference of purity of the heterologous sera for appiance in human therapeutics.

KEYWORDS: Eletrophoresis, hyperimmune sera, albumin, globulins alpha, beta and gamma.

TABELA I

Comparação das frações protêicas em números percentuais (%) do soro de cavalo determinado por vários autores.

	A	B	C	D	E	F	G
ALBUMINA	49,2	39,6	43,0	45,4	41,1	30,0	43,37
ALFA	ND	ND	ND	ND	13,7	ND	ND
ALFA 1	1,6	16,9	ND	ND	ND	8,1	ND
ALFA 1a	ND	ND	2,2	4,0	ND	ND	2,43
ALFA 1b	ND	ND	3,1	2,8	ND	ND	1,76
ALFA 2	10,2	15,0	ND	13,2	ND	ND	ND
ALFA 2a	ND	ND	12,8	ND	ND	3,7	2,59
ALFA 2b	ND	ND	5,6	ND	ND	4,3	8,38
ALFA 2c	ND	ND	ND	ND	ND	11,1	2,99
BETA	ND	13,6	ND	ND	ND	ND	ND
BETA 1	14,1	ND	11,9	13,2	13,7	13,1	6,28
BETA 2	8,9	ND	ND	7,7	7,7	10,9	ND
BETA 2a	ND	ND	3,5	ND	ND	ND	4,10
BETA 2b	ND	ND	3,7	ND	ND	ND	4,32
GAMA	15,7	14,9	ND	13,7	13,7	18,8	ND
GAMA 1	ND	ND	12,0	ND	ND	ND	7,31
GAMA 2	ND	ND	2,0	ND	ND	ND	15,87

A = Mattheus et al. 1966
B = Kao et al. 1954
C = Bierer, 1969
ND = Não Determinado
D = Massip & Fumiere, 1954
E = Osbaldiston, 1972
F = Kristensen & Firth, 1977
G = PRESENTE ESTUDO

SciELO

TABELA 2

Frações protêicas dos diferentes serviços de produção de soros Hiperimunes em números percentuais (%)

ALBUMINA	18,49 +/— 2,34	21,70 +/— 3,58	20,08 +/— 2,64	25,12 +/— 2,29	25,77 +/— 3,16	30,70 +/— 3,50	29,30 +/— 1,41	31,54 +/— 3,97	21,17 +/— 2,67	21,87 +/— 2,17	43,37 +/— 3,23
ALFA 1a	1,93 +/— 0,49	1,87 +/— 0,46	2,54 +/— 0,50	1,77 +/— 0,41	2,06 +/— 0,49	0,97 +/— 0,49	0,70 +/— 0,10	1,89 +/— 0,35	2,38 +/— 0,45	1,03 +/— 0,39	2,43 +/— 0,24
ALFA 1b	2,18 +/—	2,34 +/—	1,93 +/—	2,40 +/—	2,70 +/—	2,20 +/—	2,15 +/—	2,19 +/—	2,22 +/—	1,68 +/—	1,76 +/—
ALFA 2a	3,82 +/— 0,83	4,56 +/— 0,91	4,49 +/— 1,21	4,11 +/— 1,23	3,52 +/— 1,21	4,12 +/— 0,62	4,30 +/— 0,10	2,88 +/— 0,64	3,18 +/— 0,67	2,87 +/— 0,89	2,59 +/— 0,96
ALFA 2b	10,30 +/— 1,59	9,20 +/— 2,76	12,54 +/— 2,53	10,63 +/— 2,16	11,39 +/— 2,04	10,45 +/— 1,54	10,05 +/— 1,62	8,93 +/— 2,34	8,99 +/— 1,25	8,82 +/— 2,44	8,38 +/— 2,73
ALFA 2c	4,67 +/— 2,01	5,76 +/— 1,69	4,47 +/— 1,34	4,10 +/— 1,07	4,27 +/— 0,57	3,68 +/— 0,59	3,60 +/— 0,85	3,91 +/— 1,29	3,33 +/— 0,89	3,79 +/— 1,49	2,99 +/— 0,94
BETA 1	10,14 +/— 1,40	9,67 +/— 2,40	9,37 +/— 2,81	8,13 +/— 0,95	9,26 +/— 1,34	7,70 +/— 1,94	9,00 +/— 0,28	7,71 +/— 1,86	9,06 +/— 2,15	7,47 +/— 2,37	6,28 +/— 1,01
BETA 2a	8,56 +/— 2,80	9,37 +/— 2,58	7,20 +/— 2,09	4,65 +/— 2,08	4,64 +/— 1,17	4,08 +/— 1,12	6,30 +/— 1,98	4,43 +/— 1,41	5,87 +/— 1,67	7,12 +/— 1,70	4,10 +/— 1,30
BETA 2b	6,74 +/— 1,50	7,66 +/— 1,98	7,61 +/— 1,03	6,40 +/— 1,10	6,14 +/— 1,35	5,83 +/— 2,10	8,45 +/— 1,63	6,76 +/— 1,71	21,80 +/— 5,04	22,38 +/— 7,27	4,92 +/— 1,79
GAMA 1	8,96 +/— 1,53	7,66 +/— 1,55	6,54 +/— 1,38	8,48 +/— 2,81	8,57 +/— 1,38	6,47 +/— 1,57	7,75 +/— 2,47	10,70 +/— 2,58	6,50 +/— 1,32	6,01 +/— 1,38	7,31 +/— 1,67
GAMA 2	24,21 +/— 3,89	20,21 +/— 2,79	23,23 +/— 3,09	24,21 +/— 3,55	21,68 +/— 3,07	23,80 +/— 2,93	18,40 +/— 3,54	19,06 +/— 3,93	15,50 +/— 4,69	16,96 +/— 3,78	15,87 +/— 2,31

A — Soro Anticrotálico
B — Soro Antibotrópico
C — Soro Antibot.-crot.
D — Soro Antilaquético
E — Soro Antielapídico
F — Soro Antiescorpiônico
G — Soro Antiloxocélico
H — Soro Antiaracnídico
I — Soro Antitetânico
J — Soro Antidiftérico
L — SORO NORMAL

SciELO

TABELA 3

Frações protêicas dos diferentes serviços de produção de soros hiperimunes em números absolutos (g/dl)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L
PTNs TOTAIS	13,27	12,39	14,67	12,14	11,93	12,08	12,40	12,23	13,12	13,95	9,70
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,34	1,89	1,12	0,66	0,99	1,53	1,06	1,22	0,80	12,06	0,60
ALBUMINA	2,44	2,66	2,93	3,05	3,08	3,64	3,64	3,84	2,76	3,00	4,18
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,26	0,42	0,25	0,34	0,52	0,47	0,13	0,89	0,33	0,41	0,44
ALFA 1a	0,25	0,23	0,37	0,21	0,25	0,11	0,09	0,23	0,31	0,14	0,24
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,06	0,07	0,07	0,09	0,11	0,05	0,01	0,09	0,06	0,06	0,07
ALFA 1b	0,29	0,29	0,28	0,29	0,33	0,27	0,27	0,27	0,30	0,23	0,17
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,10	0,09	0,07	0,08	0,08	0,08	0,15	0,11	0,11	0,07	0,04
ALFA 2a	0,51	0,56	0,66	0,50	0,42	0,50	0,54	0,36	0,41	0,41	0,25
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,10	0,14	0,20	0,13	0,15	0,10	0,01	0,10	0,08	0,15	0,10
ALFA 2b	1,37	1,14	1,86	1,28	1,36	1,27	1,24	1,09	1,18	1,24	0,82
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,25	0,35	0,44	0,20	0,29	0,28	0,19	0,29	0,23	0,39	0,30
ALFA 2c	0,62	0,71	0,65	0,50	0,51	0,46	0,45	0,48	0,44	0,52	0,29
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,29	0,23	0,21	0,14	0,06	0,10	0,11	0,18	0,13	0,20	0,10
BETA 1	1,35	1,19	1,37	0,99	1,10	0,94	1,10	0,95	1,19	1,04	0,61
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,21	0,34	0,40	0,12	0,16	0,29	0,04	0,29	0,30	0,35	0,09
BETA 2a	1,14	1,19	1,06	0,57	0,55	0,50	0,78	0,56	0,77	1,00	0,40
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,40	0,45	0,34	0,28	0,10	0,17	0,25	0,23	0,24	0,33	0,14
BETA 2b	0,92	0,96	1,12	0,78	0,72	0,73	1,05	0,84	2,87	3,17	0,48
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,23	0,36	0,17	0,16	0,14	0,35	0,19	0,29	0,73	1,33	0,20
GAMA 1	1,19	0,96	0,96	1,03	1,02	0,78	0,96	1,30	0,86	0,84	0,72
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,24	0,25	0,19	0,37	0,18	0,23	0,30	0,35	0,18	0,21	0,19
GAMA 2	3,19	2,50	3,41	2,94	2,59	2,90	2,28	2,21	2,03	2,36	1,54
	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
	0,52	0,46	0,80	0,45	0,42	0,68	0,46	0,47	0,62	0,85	0,25
ALB/glob.	0,23	0,27	0,25	0,34	0,35	0,44	0,42	0,46	0,27	0,27	0,76

A — Soro Anticrotálico
B — Soro Antibotrópico
C — Soro Antibot.-crot.
D — Soro Antilaquético
E — Soro Antielapídico
F — Soro Antiescorpiônico
G — Soro Antiloxocélico
H — Soro Antiaracnídico
I — Soro Antitetânico
J — Soro Antidiftérico
L — SORO NORMAL
PTNS — Proteínas

SciELO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENJAMIN, M.M. *Outline of Veterinary clinical pathology*. 3.ed. Iowa, Iowa State University Press, 1979, 351p.
2. BIERER, B.W. Eletrophoretic analysis of blood serum and plasma proteins of normal horses. *Am. J. Vet. Res. 30*:2237-2240, 1969.
3. KAO, K.Y.T.; REAGAN, R.L.; BREUCKNER, A.K. Eletrophoretic study of horse serum of equine infection anemia. *Am. J. Vet. Res. 15*:343-345, 1954.
4. KRISTENSEN, F. & FIRTH, E.C. Analysis of serum proteins and cerebrospinal fluid in clinicaly and normal horses using agarose eletrophoresis. *Am. J. Vet. Res. 38*:1089-1092, 1977.
5. MATTHEEUWS, D.R.G.; KANKO, J.J.; LOY, R.G.; CORNELIUS, C.E.; WHEAT, J.D. Compartmentalization and turnover of 131I labeled albumin and gamma globulin in horse. *Am. J. Vet. Res. 27*:699-705, 1966.
6. MASSIP, A. & FUMIERE, I. Analyse eletrophoretique des proteines du serum sanguin de chevaux adultes normaux ages de quater a dix ans. *Ann. Med. Vet. 118*:221-229, 1974.
7. McGUIRE, T.C.; BANKS, K.L.; EVANS, D.R.; POPPIE, M.J. Agammaglobulinemia in a horse with evidence of functional T lymphocytes. *Am. J. Vet. Res. 37*:41-46, 1976.
8. NOWOTNY, A. *Basic exercises in immunochemistry*. Berlin, Springer-Verlag. 1969. 197p.
9. OSBALDISTON, G.W. Serum protein fraction in domestic animal. *Br. Vet. J. 128*:386-393, 1972.
10. WEIER, R.C. & PORTER, R.R. Comparison of the structure of the immunoglobulins from horse serum. *Biochem. J. 100*:63-68, 1966.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

Bol. Biotecnol.
v. 2, p. 15-17, 1991

PREPARAÇÃO DE SORO ALBUMINA EQÜINA POR FRACIONAMENTO SULFATO DE AMÔNIO — ETANOL — CALOR.

José Roberto MARCELINO *
Rosalvo GUIDOLIN *

RESUMO: A Técnica de Schneider foi adaptada para o aproveitamento do soro albumina eqüina, como subproduto derivado do fracionamento de plasmas eqüinos destinados à preparação de soros hiperimunes heterólogos. A adaptação consistiu na separação prévia da albumina, por precipitação com 32% de sulfato de amônio das outras proteínas, seguida de ultrafiltração da solução de albumina. A técnica proposta produziu albumina relativamente pura, com um rendimento aproximado de 90% em relação à albumina original.

UNITERMOS: Soro albumina eqüina, soros hiperimunes heterólogos.

INTRODUÇÃO

Na preparação de soros específicos, antipeçonhentos ou antitóxicos, de origem eqüina (heterólogos), grandes volumes de solução de albumina são produzidos e desprezados. O aproveitamento desse soro albumina eqüina (SAEq.) como subproduto para utilização laboratorial ou em clínica veterinária é possível pelo processo de fracionamento com álcool etílico e aquecimento a 68°C, segundo a técnica de Schneider modificada[1,2], como proposto neste trabalho. As experiências foram feitas com até 20 litros de solução inicial de albumina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado plasma hiperimune de cavalos produtores de antiveneno botrópico, tratado de acordo com o esquema abaixo.

* Instituto Butantan — Seção de Concentração e Fracionamento de Soros.
Recebido para publicação em 27.12.1990 e aceito em 21.8.1991

SciELO

PLASMA EOÜINO HIPERIMUNE diluído a 1/2 em água destilada, precipitação com 32% P/V de $(NH_4)_2SO_4$ sólido, a pH 7,0, agitação de 200rpm durante 1 hora, repouso de 4 horas. Temperatura ambiente.

CENTRIFUGAÇÃO — em centrífuga Alfa-Laval de fluxo contínuo

- PRECIPITADO — produção de soro hiperimune
- SOBRENADANTE — albumina e outras proteínas em solução

ULTRAFILTRAÇÃO — em cassette "Pelicon" até eliminação do $(NH_4)_2SO_4$

ADIÇÃO DE ETANOL 98°GL — até concentração de 9% V/V e 0,004 M v/v de ácido caprílico, sob agitação de 200rpm. Ajuste de pH a 6,5 com NaOH 20%

AQUECIMENTO EM BANHO-MARIA — 68°C durante 30 minutos

AJUSTAR o pH a 4,4 com HCl 2,5M

FILTRAÇÃO EM PAPEL WATHMAN nº 50

- PRECIPITADO — descartado
- SOBRENADANTE

ULTRAFILTRAÇÃO — para concentração da albumina. Correção do pH a 7,0 com solução de NaOH a 20%

FILTRAÇÃO ESTERILIZANTE — em membrana 0,22 μ "Millipore".

Os recipientes e hastes de agitação eram de aço inoxidável. As temperaturas nas diferentes fases foram as ambientes (ao redor de 25°C) a não ser quando especificamente mencionadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

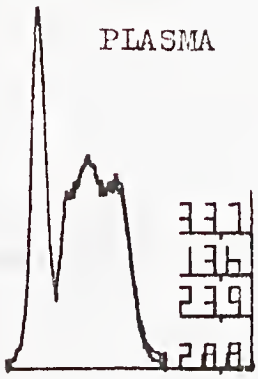
Antes da concentração por ultrafiltração, obteve-se uma solução de cor amarelo-palha, transparente, contendo aproximadamente 90% da albumina original. Nesta fase, a concentração de SAEq foi 1,6%, resultado esse plenamente concordante com aquele obtido por Schneider (1,2) quando utilizou plasma humano fracionado diretamente com 9% de álcool, a 68°C, seja, sem uma precipitação prévia com o sulfato de amônio. Em experiências realizadas com plasma eqüino hiperimune, seguindo exatamente a técnica descrita por Schneider, foi verificada uma grande dificuldade na filtração da albumina, fato também citado[1,2] pelo autor, sugerindo a necessidade de introdução no sistema de um filtro com características especiais (filtração aluvial). No entanto, com o fracionamento prévio pelo sulfato de amônio, grande parte de outras proteínas é eliminada, condição esta que favorece substancialmente a filtração após a precipitação alcoólica a quente.

A pureza da SAEq preparada conforme o esquema é apresentada no eletroferograma II, podendo, em seguida, ser submetida a técnicas cromatográficas que melhorem a sua pureza; à concentração por ultrafiltro ou, ainda, à secagem.

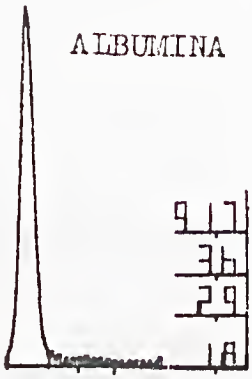
Eletroferograma I plasma antibotrópico hiperimune

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

Eletroferograma I
Plasma antibotrópico hiperimune



Eletroferograma II da SAEq. com 1,6% de albumina após tratamento.



AGRADECIMENTO

Ao Dr. Marco A. Stephano pelas provas de eletroforese.

ABSTRACT: The Schneider's technique was adapted in order to utilize the equine serum albumin as a sub-product, arise from the equine plasma fractionation destined to produce heterologons hyperimmune sera. The adaptation consisted in the previous albumin isolation after 32 per cent amonium sulphate precipitation of the other proteins and followed by the ultrafiltration of the albumin solution.

KEYWORDS: Equine serum albumin, heterologons hyperimmune sera.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CURLING, J. M. Separation of plasma proteins — Pharmacia Fine chemicals AB, UPPSALA, 1983.
2. SCHNEIDER, W., WOLTER, D., MCCARTY, L. J. Technical improvement in heat-ethanol isolation of serum albumin. Blut, v. 33, p. 275 — 280, 1976.

SciELO

Bol. Biotecnol.
v. 2, p. 19-23, 1991

PRODUÇÃO DE ANATOXINA ESTAFILOCÓCICA PURIFICADA

Joana Akiko FURUTA*
Edison Paulo Tavares de OLIVEIRA*
Sandra de Jesus Delgado MATIAS*
Hisako Gondo HIGASHI*

RESUMO: As toxinas produzidas pelas cepas de *S. aureus* Wood nº 3, C24 nº 6 e C24 nº 7, desenvolvidas conforme a técnica descrita, produziram anatoxinas que, submetidas à purificação e concentração com solução a 33% de sulfato de amônio, permitiram a obtenção de vacinas com elevada atividade imunogênica e baixos teores de impurezas.

UNITERMOS: *S. aureus*, toxinas, anatoxinas purificadas.

INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus*, responsável por vários processos supurativos humanos, superficiais ou profundos e, estes, às vezes, de caráter grave e mesmo mortais, tem sido estudado por vários pesquisadores desde 1928, quando 12 de 21 crianças após terem sido injetadas com toxóide diftérico morreram em menos de 24 horas. Verificou-se que aquela mistura estava contaminada com *S. aureus* toxigênico (1). Este fato estimulou novas pesquisas de caráter antigênico e toxigênico do filtrado de culturas de *S. aureus*, e Dolman (2,3,4) demonstrou o valor do toxóide estafilocócico na terapia e profilaxia de infecções estafilocócicas. Gladstone e Glencross (5) verificaram que cepas selecionadas de *S. aureus*, em condições adequadas de cultivo, produzem a alfatoxina letal e fatores dermonecrotizantes e tetanizantes. Baseados nestes conhecimentos, os autores, no presente trabalho, demonstram a técnica de preparação e controle da Anatoxina Estafilocócica purificada, ainda utilizada no tratamento e prevenção de infecções estafilocócicas humanas, especialmente aquelas superficiais recidivantes.

* Serviço de Imunologia
Instituto Butantan — CP 65 — CEP 01051 — São Paulo-SP — Brasil
Recebido para publicação em 19.6.1991 e aceito em 30.8.1991

SciELO

MATERIAL E MÉTODO

1 — Cepas estudadas

— Wood nº 3, C24 nº 6, e C24 nº 7, cedidas pela Seção de BCG do Instituto Butantan

2 — Características das cepas estudadas

2.1 — Verificação da pureza por semeadura em:

2.1.1 — Caldo glicosado 1% (9), incubados a 37°C durante 24 horas e exame microscópico de lâminas coradas pelo método de Gram

2.1.2 — Placa de ágar sangue, incubada a 37°C durante 24 horas e exame microscópico das colônias de halo de hemólise.

2.2 — Seleção das colônias:

2.2.1 — Por semeadura em ágar simples (9), as colônias adequadas devem apresentar, após 24 horas a 37°C: superfície convexa e lisa, com 1 a 3mm de diâmetro, bordas circulares e opacas.

2.2.2 — Pigmentação: colônias de *S. aureus* patogênico em ágar simples, após 24 a 48h à temperatura ambiente desenvolvem pigmento amarelo mais ou menos intenso, ao passo que os estafilocócicos saprófitas formam colônias brancas.

2.2.3 — Atividade hemolítica: amostras semeadas em ágar simples adicionado de 5 a 10% de sangue de carneiro, incubados a 37°C durante 24 horas, freqüentemente determinam halo de hemólise de aproximadamente 10 à 30mm.

2.2.4 — Identificação perfunctória das cepas patogênicas: por semeadura em meio de Chapman-Stone (10) e incubação a 37°C, durante 24 a 48 horas, as cepas patogênicas produzem pigmento amarelo, fermentam a manita e hidrolisam a gelatina.

3 — Obtenção de alfatoxina e fatores:.

Cada uma das amostras, após 24 horas de cultivo em caldo glicosado a 37°C, foi semeada em Caldo Martin (9) e Caldo soja (9) pela deposição de 8-10ml de inóculo em 180ml dos meios. O material foi incubado durante sete dias a 37°C em estufa apropriada com 20% de dióxido de carbono (CO_2).

3.1 — Provas

3.1.1 — Pureza: exame microscópico de lâminas coradas pelo Gram deve apresentar: cocos gram positivos com cerca de 1um de diâmetro, dispostos isoladamente, aos pares ou, menos freqüentemente, em cadeias.

3.1.2 — Titulação da toxina: uma alíquota de 5ml foi centrifugada durante 30 minutos a 3.000 rpm em centrífuga refrigerada 4°C. O pH sobrenadante foi corrigido a 6,8 — 7,0 com solução de HCl e filtrado em série (pré-filtro AP15 membranas inertes de 0,45 e 0,22um), e testada como segue:

3.1.2.1 — Determinação da Dose Mínima Hemolítica: (DMH) (7,11). O material foi diluído em série em salina tamponada pH 7.2, na faixa de 1:500 a 1:8.546. Em cada tubo era colocado 1ml de cada diluição e adicionado 0,1ml de hemácias de coelho, a 10% (lavadas três vezes em salina tamponada). Os tubos, após 60 minutos em banho-maria a 37°C, foram centrifugados a 1.500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente.

Os resultados foram obtidos por leitura comparativa do centrifugado com uma escala padrão de Hemólise. Foi considerada como a DMH o volume de toxina indutor de 50% de hemólise.

3.1.2.2 — Determinação do limite hemolítico (LH): Os resultados foram obtidos pela aplicação do método padronizado pelo NHI (11) e o soro padrão utilizado, proveniente do International Lab. of Biol. Statens Seruminstitut — Copenhagen. O LH deverá ser igual ou menor do que 0,075ml.

4 — Preparação da Anatoxina

SciELO

4.1 — Centrifugação e filtração da toxina: Os conteúdos de garrafas que se apresentaram puras foram misturados, centrifugados a 3.000 rpm a 4°C por 30 minutos. O pH do sobrenadante foi corrigido a 6,8 — 7,0, com solução de Ácido Clorídrico 20% e o material filtrado em pré-filtro AP15 membranas inertes, em série, de 0,45 e 0,22μm.

4.2 — Detoxificação: obtida pela ação de 0,5% de formalina a 37°C durante 30 dias, com agitação periódica.

4.3 — Provas

4.3.1 — Toxicidade específica

a) Teste dermonecrótico: Coelhos albinos de dois quilos, inoculados seja por via intradérmica com 0,2ml de material ou com 2,0ml por via subcutânea não devem apresentar necrose durante os quinze dias de observação.

b) Teste de letalidade: Coelhos albinos de dois quilos, inoculados por via venosa com 3,0ml de material/kg devem sobreviver, sem apresentar sintomas, durante um período de quinze dias de observação.

c) Teste de inocuidade em cobaios: Três cobaios de 200 a 400g de peso, inoculados com 5ml do material por via subcutânea (região abdominal) devem sobreviver, sem apresentar sintomas, durante um período de quinze dias de observação.

4.3.2 — Capacidade combinatória

Determinação da dose combinante ''Line binding'' (L.B.) (7,11). O material foi distribuído em tubos contendo 1UI de soro padrão, em volumes crescentes de anatoxina e completado o volume a 2,0ml com solução salina tamponada pH 7.2. Aos tubos, após 20 minutos em banho-maria a 37°C, foi adicionada toxina padrão contendo 1 limite hemolítico e incubados a 37°C em banho-maria por mais 20 minutos e, finalmente, adicionado 0,1ml de uma suspensão a 10% de hemácias de coelho. Os tubos incubados em banho-maria 37°C por uma hora foram centrifugados a 1.500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. Os resultados foram obtidos por leitura comparativa do centrifugado com a escala padrão de hemólise. Foi considerada como a dose combinante (LB) o volume da anatoxina que induziu a traços de hemólise.

5 — Preparação da Anatoxina Purificada

A concentração da anatoxina foi inicialmente realizada pelo processo de ultrafiltração molecular (12) em membrana de 10.000 d. Obtida concentração de 5 vezes o produto foi submetido à precipitação seletiva à temperatura ambiente com 33% p/v de sulfato de amônio. Após a precipitação o pH foi acertado para 7,0 com uma solução de hidróxido de sódio 40% e a mistura mantida em repouso a 4°C por uma noite.

O material foi centrifugado a 3.000 rpm por 30 minutos à temperatura de 4°C, e o precipitado ressuspenso em água destilada a 1/16 do volume inicial.

Após dessalinização por ultrafiltração molecular, o produto foi novamente concentrado a 1/16 do volume inicial, isotonizado a 0,85% de NaCl, o pH reajustado para 6,0-7,0 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 40% e adicionado de Timerosal, a 1/10.000, como preservativo.

O produto assim preparado foi esterilizado por passagem em membranas inertes, constando de um pré-filtro AP15 e de 0,45 e 0,22μm e conservado a 4°C.

5.1 — Provas efetuadas após purificação

5.1.1 Inocuidade (3)

Foram realizados os mesmos testes citados nos itens 4.3.1 e 4.3.2

5.1.2 — Esterilidade (3). Em meio de Tioglicolato Brewer e Caseína soja por semeadura de 3ml do produto em 100ml do meio.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

5.1.3 — Atividade Imunogênica (7). Oito coelhos albinos pesando de 2 a 3 quilos foram inoculados por via intramuscular como segue:

1ml, 2ml e 3ml com intervalo de 7 dias. No 7º dia após a última dose foram extraídos 2ml de sangue, da veia da orelha. Volumes iguais dos respectivos soros foram misturados e o "pool" titulado pelo método hemolítico.

O título foi considerado satisfatório quando apresentava no mínimo 3 unidades superiores ao título inicial, determinado por L.B.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção de anatoxina estafilocócica purificada, com atividade imunogênica adequada à aplicação humana com fins curativos ou profiláticos é imprescindível a utilização de cepas selecionadas de *S. aureus* produtoras de exotoxinas. Os autores verificaram que as amostras Wood nº 3, C24 nº 6 e C24 nº 7 cultivadas em Caldo Martin e Caldo Soja, sob 20% de tensão de dióxido de carbono, apresentaram bons resultados.

As anatoxinas assim preparadas podem ser purificadas e concentradas por precipitação com solução a 33% de sulfato de amônio, visando, além da concentração de atividade imunogênica, à redução de efeitos indesejáveis no homem devidos a fenômenos de hipersensibilidade individual. Na rotina produtiva, rendimentos mais elevados foram conseguidos pelo tratamento da anatoxina com 50% de sulfato de amônio.

ABSTRACT: The toxins produced by *S. aureus*, sample Wood nº 3, C24 nº 6 and C24 nº 7 developed as described, produced anatoxins that, submited to the purification and concentration with 33% of amonium sulfate solution permited vaccines obtention with high immunogenic activity degree and low impurity concentration.

KEYWORDS: *S.aureus*, toxins, purified anatoxins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DOLMAN, C.E. et al. Treatment of localized Staphyloccic infections with Staphylococcus toxoid. *J. Amer. Med. Ass.*, v. 100, 13; p. 1007 — 1010, 1933
2. DOLMAN, C.E. et al. Tests for innocuity and antigenic potency of Staphylococcus toxoid. *J. Path. Bact.*, v. 41, p. 137-162, 1935
3. DOLMAN, C.E. et al. Staphylococcus toxin, toxoid, and anti toxin. *Canad. Publ. Health J.*, v.27, 11, p. 529-535, 1936.
4. GLADSTONE, G.P. & GLENCROSS, E.J.G. Growth and toxin production of Staphylococci in cellophane Saca *"in vivo"*. *Brit. J. Exp.* Path., v. 41; p. 313 — 333, 1960.
5. KAPRAL, F.A. et al. The nature of Alpha toxin production by *Staphylococcus aureus* Grown "in vivo". *Proc.Soc.Exp.Biol.* Med., v. 119, p.74-77, 1965.
6. LEONARD, G.F. & HOLM, A.A method for the production of Staphylococcus toxin and toxoid. *J. Immunol.*, v. 29,3, p.209-221, 1935.
7. INTERNATIONAL CONGRESS FOR MICROBIOLOGICAL STANDARTIZATION, 7,1 962, London. Proceedings of 7th. Cópia cedida pelo Dr. Ruppert Ludwig Hahnstadt em 12/11/86, Alerbrás, Rio.
8. TÉCNICA de Preparação da Anatoxina Estafilocócica — Manual de Produção de Anatoxina Estafilocócica do Setor de Aeróbios do Instituto Butantan.
9. MILLIPORE. Técnica de ultrafiltração molecular, por meio do Sistema Pellicon, 1987. (Implantado no Setor de Aeróbios do Instituto Butantan).
10. TENTATIVE Staphylococcus toxoid requirements: National Institute of Health, Washington, D.C. August 25, 1938.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

11. TOXÓIDE estafilocócico. Anexo n. 08. Ref. à Portaria n. 11, 08/7/58. *Diário Oficial*, 14 jul. 1958.
12. TOXÓIDE estafilocócico. Anexo 15. Trab. apres. no Seminário sobre Técnicas e Normas de Produção e Controle de Vacinas e Soros de Uso Humano no Brasil — CEME-27 a 31/5/74.

SciELO

MEMÓRIAS

DO

INSTITUTO BUTANTAN

Volume 53, 1991

Mem. Inst. Butantan	v. 53	n. 1,2,supl.1	p.119-23	1991

SciELO

ÍNDICE DE AUTOR / AUTHOR INDEX
VOL. 53

ADLER, C. 119
ALMEIDA, E. 71
ALMEIDA, M. S. de 213
ALVARADO, J. 181
ANTONIO, L.C. 213, 218
ARNHOLDT, A.V. 219
ASSAKURA, M.T. 213
AYMERICH, R. 218
BARRETTO, O.C. de O. 213
BEÇAK, W. 11
BERGMANN, I.E. 59
BERRO, O.J. 219
BERTANI, R. 161
BIOZZI, G. 224
BRAGANÇA PEREIRA, C.A. de 222
BRAZ, S. 220
BRENO, M.C. 214
BRODSKYN, C.I. 220, 224
CABELLO, P.H. 219
CAMARGO, A.C.M. 216
CAMPUS, G. 21
CARDOSO, J.L.C. 213, 214
CARMONA, E. 216, 218, 219
CARPENTER, M.R. 215
CHAGAS, J.R. 216
CHAGURI, L.C.A.G. 175, 223
CHUDZINSKI, A.M. 218
COLLETTO, G.M.D.D. 149
CONTU, B. 21
CORDEIRO, C.L. dos S. 216
CORRÊA, F.M.A. 216, 217
COSSU, M.A. 21
COSTA, E.M. 219
CREPALDI, R.F. 221
CURI, P.R. 217
DAMY, S.B. 175, 223
DE CILLO, D.M. 213
DECREUSEFOND, C. 224
DIAS DA SILVA, W. 3, 149, 220
DI BERNARDO, M. 167
D'IMPÉRIO LIMA, M.R. 220
DOMENIGHINI, M. 15
DOMINGOS, M.O. 214
DORCE, V.A.C. 221
DURAN, N. 214
ESTRADA, R. 181
FANG, F.L.W. 222
FETT — CONTE, A.C. 215
FRANCINI, F. 205
FRASCH, C.E. 77
FREITAS, J.C. de 191
FURTADO, M.F.D. 149, 213, 218, 220

SciELO

FURUTA, J.A. 19
GALLINA, N.M.F. 222
GAMBARINI, A.G. 215
GATTI, M.S.V. 214
GOLDENBERG, S. 71
GONZÁLEZ, N. 181
GORDO, M. 135
GRISOLIA, C.S. 205
GUIDOLIN, R. 3, 15
GUIMARÃES, E.S.P. 219
GUTIÉRREZ, J.M. 218
HENRIQUES, S.B. 213
HIGASHI, H.G. 3, 19
HIRATA, I.Y. 216
HO, P.L. 215
HOSSLE, P. 119
IBANEZ, O.M. 224
JORGE, M.T. 215, 216, 221, 222
JULIANO, L. 216, 219
KAMIGUTI, A.S. 218
KAWANO, T. 216
KELEN, E.M.A. 218
KRIEGER, H. 219
KRIEGER, M.A. 71
KUSANO, E.J.V. 216
LAFAILLE, J.J. 71
LAZARI, M.F.M. 214
LEITE, L.C.C. 214
LEME, V.M.C. 219
LEOPOLDO-E-SILVA, R. 217
LIMA, A.T.V.C. 219
LO CASCIO, R. 119
LOMONTE, B. 218
LUCAS, S. 161
MACEDO, M.S. 223
MALUCELLI, M.I.C. 221
MANDELBAUM, F.R. 213
MARCELINO, J.R. 15
MARCUCCI, M.C. 214
MAROUES, O.A.V. 127
MARSILI, I. 21
MARTINS, M. 197
MATIAS, J.D. 19
MARUYAMA, M. 218
MASSA, S. 223
MEIER, J. 119
MEIRELLES, M.N.L. 219
MENDES, I.F. 222
MENDONÇA, J.S. de 216
MIHARA, H. 218
MOREIRA, G. 197
MORENA, P. 213, 218
MORO — FURLANI, A.M. 219
MOTA, I. 214, 220, 223, 224, 225
MOURA DA SILVA, A.M. 214, 220

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

MOUTON, D. 224
MUTTI PEREIRA, M.M. 221
NENCIONI, L. 15, 21
NEUMANN, B.G. 220
NEWTON, S.M.C. 53
NISHIKAWA, A.K. 220
NISHIOKA, S. de A. 222
NONOYAMA, K. 213
OELEMANN, W. 71
OGAS, S. 220, 224
OLIVEIRA, E.B. 216
OLIVEIRA, E.P.T. de 19
OLIVEIRA, E.S. 216
OSHIRO, T.T. 220, 224
OTERO, R. 218
PADOVANI, C.R. 217
PALERMO — NETO, J. 221
PELUSO, F.O. 205
PEPPOLONI, S. 21
PEREIRA, A. 221
PERINI, A. 223
PICARELLI, Z.P. 214
PIESCO, R.V. 222
PIETRO PEREIRA, A.S. 221
PIZZA, M.G. 15
PODDA, A. 15, 21
POMBAL JR., J.P. 135
PRAL, M.M. 222
PREZOTO, B.C. 214
PUORTO, G. 127
RAPPUOLI, R. 15, 21
RIBEIRO, L.A. 215, 216, 221, 222
RIBEIRO, O.G. 224
RIZZO, E. de 222
ROBLES, A. 181
RODRIGUES, U.P. 175, 223
ROJAS, E. 181
ROJAS, G. 218
ROSSO, J.P. 218
ROVIRA, M.E. 218
SAKAUCHI, M.A. 221
SANO — MARTINS, I.S. 218
SANTANA, E.Q. de 223
SANT'ANNA, O.A. 213, 223
SANTORO, M.L. 218
SANTOS, M.C. dos 220
SANTOS, R.E.S. 215
SAZIMA, I. 167
SCHARFSTEIN, J. 219
SEGURA, E. 181
SHIMIZU, Y. 221
SILVA, A.C. da. 223
SILVA, A.M.M. da. 224
SILVA JR., P.I. da 161
SILVA, L.F. 224

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

SILVA, M.L.R. da 216
SILVA, S.G. 219
SILVESTRI, S. 15, 21
SIMÕES, L.C.G. 216
SIQUEIRA, M. 224
SMILLIE, L.B. 215
SOARES, M.F.M. 223
SOGORB S., F. 175, 223
STEPHANO, M.A. 3
STIFFEL, C. 224
STOCKER, B.A.D. 53
SUCUPIRA, M. 216
TAJARA, E.H. 215
TAKATA, C.S. 222
TAKEHARA, H.A. 224
TEIXEIRA, C.F.P. 220, 224
TENÓRIO, E.C.N. 222
TOFFOLETTO, O. 214
TOMY, S.C. 218
TORDO, N. 31
TRONCONE, L.R.P. 220
TUFIK, S. 220
UMEKITA, L.F. 225
VANNI, R. 15, 21
VARELLA — GARCIA, M. 215
VARGAS, O. 218
VIEIRA, E.G.J. 213
VOLPINI, G. 21
YAMANOUYE, N. 214
YASAKA, W.J. 224

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

CONTEÚDO/CONTENTS
Volume 53, 1991

Nº 1

The influence of three different drying procedures on some enzymatic activities of three Viperidae snake venoms.
A influência de três diferentes processos de secagem em algumas atividades enzimáticas de três venenos da serpente Viperidae.
Jürg MEIER, Christoph ADLER, Paul HÖSSLE, Rosario Lo CASCIO . 119

Padrões cromáticos, distribuição e possível mimetismo em *Erythrolamprus aesculapii* (Serpentes, Colubridae)
Color patterns, distribution, and possible mimicry in *Erythrolamprus aesculapii* (Serpentes, Colubridae)
Otávio A.V. MAROUES, Giuseppe PUORTO 127

Duas novas espécies de *Hyla* da Floresta Atlântica no Estado de São Paulo (Amphibia, Anura)
Two small species of *Hyla* from the Atlantic Forest of the São Paulo state (Amphibia, Anura)
José P. POMBAL JR., Marcelo GORDO 135

Supl. 1

Willy Beçak — Opening Remarks 11

M.G. Pizza, M. Domenighini, L. Nencioni, A. Podda., R. Vanni, S. Silvestri, R. Rappuoli — Engeneering bacterial toxins for the development of new vaccines 15

L. Nencioni, A. Podda, S. Peppoloni, G. Volpini, I. Marsili, B. Contu, G. Campus, M.A. Cossu, R. Vanni, S. Silvestri, R. Rappuoli — Evaluation of a cellular DPT vaccines in infants 21

Noël Tordo — Contribution of molecular biology to vaccine development and molecular epidemiology of rabies disease . . . 31

S.M.C. Newton, B. A. D. Stocker — Insertion of heterologous epitopes in *Salmonella* Flagellin 53

Ingrid E. Bergmann — The impact of recombinant DNA on the control of animal health 59

S. Goldenberg, M.A. Krieger, J.J. Lafaille, E. Almeida, W. Oelemann — Use of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens in the immunological diagnosis of Chagas Disease 71

Post-Symposium Lecture

Carl E. Frasch — Perspectives on production of group B Meningococcal vaccines 77

SciELO

Nº 2

Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas.
Quality control of animal venoms and of their correspondent antivenoms: I. Standardization of the assay methods to analise the biochemical and pharmacological properties of venoms from some snakes belonging to the genus *Bothrops* and *Crotalus* by using samples of venoms dried on at room temperature or lyophilized.
M.F.D. FURTADO, G.M.D.D. COLLETTO, W. DIAS DA SILVA 149

The Brazilian species of the spider genus *Ephebopus* Simon, 1892 (Araneae, Theraphosidae, Avicullariinae), with description of E. *natuman*, n.sp.
As espécies brasileiras do gênero *Ephebopus* Simon, 1892 (Araneae, Therephosidae, Avicullariinae) com descrição de *Ephebopus natuman*, sp. n.
Sylvia LUCAS, Pedro Ismael da SILVA JR., Rogério BERTANI 161

Albinismo em serpentes neotropicais
Albinism in Neotropical Snakes
Ivan SAZIMA, Marcos DI BERNARDO 167

Variação na composição do leite da coelha *(Oryctolagnus cuniculus)*
Variation in the composition of rabbit's milk *(Oryctolagnus cuniculus)*
F. SOGORB S., S.B. DAMY, U.P. RODRIGUES, L.C.A.G. CHAGURI ... 175

Development of antibody response and clinical and hemalogical alterations in horses immunized with snake venoms for the production of antivenom in Costa Rica.
Desenvolvimento da resposta imunitária e alterações clínicas e hematológicas em cavalos imunizados com venenos de serpentes para produção de antiveneno na Costa Rica.
Ricardo ESTRADA, Abel ROBLES, Jorge ALVARADO, Ermila ROJAS, Nuria GONZÁLEZ, Eduardo SEGURA, José Maria GUTIÉRREZ 181

Nomenclatura em toxinologia. Relações com a comunicação química entre organismos e propriedades biológicas das toxinas.
Nomenclature in toxinology. Relations with the chemical comunication between organisms and biological properties of toxins.
José Carlos de FREITAS 191

The nest and the tadpole of *Hyla wavrini*, Parker (Amphibia, Anura)
Os ninhos e os girinos de *Hyla wavrini*, Parker (Amphibia, Anura)
Marcio MARTINS, Glória MOREIRA 197

Influencia del ayuno sobre la producción de veneno en *Bothrops alternatus* (Qphidia: Viperidae: Crotalinae)
Starvation period and snake venom prodution in *Bothrops alternatus* (Ophidia: Viperidae: Crotalinae)
F. FRANCINI, F.O. PELUSO, C.S. GRISOLIA 205

COLETÂNEA DE RESUMOS DE TRABALHOS PUBLICADOS PELOS PESQUISADORES DO INSTITUTO BUTANTAN (1990) 213

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA 1

SciELO

COMPOSIÇÃO, FOTOLITO E IMPRESSÃO
IMPRENSA OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP
Rua da Mooca, 1921 — Fone: 291-3344
Vendas, ramais: 257 e 325
Telex: 011-34557 — DOSP
Caixa Postal: 8231 — São Paulo
C.G.C. (M.F.) N.º 48.066.047/0001-84

GOVERNO DE SÃO PAULO
CONSTRUINDO UM FUTURO MELHOR

SciELO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: Página de rosto: título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. Texto: Introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. Material de referência: resumos (em português e inglês); unitermos (palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo, devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês).
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.
   Exemplos:
   Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA Fº, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. Mem. Inst. Butantan, v.40/41, p. 1-9, 1976/77.
   As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.
   Exemplos:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos, etc) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha à parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22x12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 30 (trinta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 20 para os autores.
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished text and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31 x 21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: Title page: with article title, name of author(s), professional address. Text: with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, abstracts (in Portuguese and English), and keywords. A maximal number of 03 keywords should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.
   Examples:
   Books
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Articles
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA Fº., J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. Mem. Inst. Butantan, v.40/41, p.1-9, 1976/77.
   Citations in the text should be identified by the reference number
   Examples:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. Illustrations (photographs, tables, figures, etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure of photograph the name of the author(s) should be lightly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white. Thirty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.

SciELO

ISSN 0073 - 9901

IMPRENSA OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP
SÃO PAULO – BRASIL
1992

GOVERNO DE SÃO PAULO

SciELO